ชื่อโครงการ การประยุกต์ใช้โปรไบโอติกเพื่อเพิ่มผลผลิตในการเลี้ยงปลากะพงขาวเชิงอุตสาหกรรม

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2557 จำนวนเงิน 707,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2556 ถึง เดือนพฤศจิกายน พ.ศ.2557

ชื่อผู้วิจัย ผศ. มนัส คงศักดิ์ (วท.ม.วาริชศาสตร์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก)

น.ส. ปฐมาภรณ์ ทิลารักษ์ (วท.ม.ชีววิทยา, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก)

บทคัดย่อ

ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการบ่มจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่แยกได้จากลำไส้ปลากะรังบนอาหารเม็ดตามแผนการทดลองแบบ CRD ทำ 4 ซ้ำโดยมีปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นเท่ากับ 6.7×10^{7} CFU/mL ตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตบนอาหารสูตร PCA และ MRS หลังบ่มเป็นเวลานาน 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที ตามลำดับ พบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหารสูตร PCA เป็นดังนี้ $5.0 \pm 0.8 \times 10^{4}$, $1.3 \pm 0.2 \times 10^{5}$, $3.0 \pm 0.8 \times 10^{4}$, $1.0 \pm 0.2 \times 10^{2}$ และ $2.0 \pm 0.0 \times 10^{2}$ CFU/mL ตามลำดับ และปริมาณ Lactic acid bacteria ที่ตรวจพบบนสูตรอาหาร MRS เป็นดังนี้ $2.0 \pm 0.2 \times 10^{3}$, $1.0 \pm 0.0 \times 10^{4}$, $2.0 \pm 0.0 \times 10^{2}$, $3.0 \pm 0.0 \times 10^{2}$ และ $2.0 \pm 0.0 \times 10^{1}$ CFU/mLตามลำดับผลการวิเคราะห์ทางสถิติแสดงให้เห็นว่า ระยะเวลาบ่ม 30 นาทีทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและจุลินทรีย์โปรไบโอติกเพิ่มปริมาณสูงที่สุดและสูงกว่าระยะเวลาอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

การตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่เหมาะสมในการเลี้ยงปลากะพงขาว วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำ 3 ซ้ำ โดยการสเปรย์จุลินทรีย์โปรไบโอติกในอัตรา 10, 20 และ 30 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ใช้เวลาบ่มนาน 30 นาทีก่อนนำไปเลี้ยงปลากะพงขาวที่มีน้ำหนักและความยาวตัวเฉลี่ยเริ่มต้น 1.97±0.29 กรัม และ 4.89±0.08 เซนติเมตร ตามลำดับ ในบ่อผ้าใบขนาด 1.8 ตัน ที่ความหนาแน่น 16 ตัวต่อตารางเมตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ปลาทดลองมีน้ำหนักตัวเท่ากับ 0.40±0.02, 0.4±0.01, 0.5±0.02และ 0.5±0.02 กรัมตามลำดับ และทำให้อัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเท่ากับ 0.40±0.02, 0.44±0.01, 0.48±0.01 และ 0.51±0.02กรัมต่อวัน ตามลำดับ การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในปริมาณ 20 - 30 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ทำให้น้ำหนักปลากะพงขาวและอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าการใช้ในปริมาณ 0- 10 มิลลิลิตรต่ออาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และพบว่า ปลาทดลองมีการรอดตายและอัตราแลกเนื้อแตกต่าง

กันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (*P>0.05*) โดยแต่ละชุดการทดลองมีการรอดตายคิดเป็นร้อยละ 57.6±12.3, 67.6±3.2, 67.7±7.0 และ 73.9±8.0 ตามลำดับ และมีอัตราแลกเนื้อคือ 1.4±0.3, 1.1±0.1, 1.1±0.1 และ 1.0±0.1 ตามลำดับ

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกที่แยกจากลำไส้ปลากะรังในการเพิ่มผลผลิตปลากะพงขาว ทำการเลี้ยงปลากะพงขาวขนาดเริ่มต้นเฉลี่ย11.6 เซนติเมตร ในกระชังขึ้นลงตามน้ำขนาด 4 x 4 ตารางเมตร ด้วยความหนาแน่น 286 ตัวต่อกระชัง แบ่งปลาออกเป็น 2 กลุ่ม (กลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม) มี 3 ซ้ำ ปลากลุ่มทดลองกำหนดให้ได้รับจุลินทรีย์โปรไบโอติกในปริมาณ 20 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม วันละ 1 ครั้ง ส่วนกลุ่มควบคุมให้กินอาหารปกติไม่เสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติก ใช้ระยะเวลาทดลอง 90 วัน ผลพบว่า ปลาในชุดทดลองมีน้ำหนักตัวเฉลี่ยและน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นต่อวัน (488.1±0.05 กรัม และ 5.07±0.19 กรัม/วัน, ตามลำดับ) สูงกว่ากลุ่มควบคุม (472.7±0.07 กรัม และ 4.49±0.03 กรัมต่อวัน ตามลำดับ) และมีค่าอัตราแลกเนื้อ (1.36±0.04) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (1.53±0.32) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P<0.05*) ส่วนอัตรารอดไม่แตกต่างกันทางสถิติ (*p*>0.05) ในทุกชุดการทดลอง ผลการทดลองสรุปว่าการใช้โปรไบโอติกที่แยกได้จากลำไส้ปลากะรังทำให้ผลผลิตปลากะพงดีขึ้น

Project Title: Probiotic Applications for Sea bass Cultivation Industry

Year of Research Grants: 2013 Budget 707,000 Baht

Period of research: 1 yrs. Since November, 2013 to November, 2014

Name of Researcher: 1) Asso. Prof. Manus Kongsuk, (M.sc. Marine Science)

2) Miss PatamapornTilaruk, (M.Sc. Biology)

Rajamangala University of Technology Tawan-Ok:
Chanthaburi Campus)

Abstract

An optimal period to incubate the probiotic bacteria, on the pellet feed before feeding was examined, using the Completely Randomized Design (CRD; 4 reps/trt). The probiotic bacteria, which isolated from the intestine of grouper, were sprayed on pellet feed and incubated for 20, 30, 40, 50 and 60 minutes with the original inocolum of 6.7 X 10^7 CFU/mL Microbial colonies in the body of PCA and MRS, nutrient medium, was then counted by eyes. After incubation, viable total microbes counting from PCA medium are as the following; $5.0\pm0.8x10^4$, $1.3\pm0.2x10^5$, $3.0\pm0.8x10^4$, $1.0\pm0.2x10^2$ and$2.0\pm0.0x10^2$ CFU/mL, respectively. While, viable lactic acid bacteria counted from MRS medium are as the following; $2.0\pm0.2x10^3$, $1.0\pm0.0x10^4$, $2.0\pm0.0x10^2$, $3.0\pm0.0x10^2$ and $2.0\pm0.0x10^1$ CFU/mL, respectively. The results showed that the incubation of 30 minutes showed a significantly higher number of total microbial and probiotic bacteria than other treatments ($P<0.05$).

An appropriate quantity of the probiotic bacteria for Sea bass cultivation was investigated. It was using the CRD with 3 reps/trt. Four ratios of probiotic volume, 0, 10, 20 and 30 mL, were sprayed on a kilogram feed and incubated for 30 minutes before feeding to experimental fish. Initial body weight and length of Sea bass were 1.97±0.29 g and 4.89±0.08 cm, respectively. The fish were raised in 1.8 m^3 circular canvas fish tanks (300 fishes per tank) for 8 weeks. By the end of experiment, the

mean fish final weights were 0.40±0.02, 0.4±0.01, 0.5±0.02 and 0.5±0.02 grams, respectively. While the mean daily weight gains were 0.40±0.02, 0.44±0.01, 0.48±0.01 and0.51±0.02 grams/day, respectively. The fish supplemented by 20-30 mL of probiotic per a kilogram trended to provide the higher body weight and daily weight gain than the supplementing by 0- 10 mL per a kilogram feed ($P< 0.05$).

The efficacy of probiotic bacteria for increasing Sea bass productivity was studied. The Sea bass with average body length of 11.6 cm were stocked in 4x4 m^2 floating cages at a density 286 fish/cage. The fish were divided into treatment and control group with 3 replicate each. Fish were fed to satiation twice daily at 08:00 a.m. and 16:00 p.m. for 90 days rearing periods. However, in the treatment group, the fish were supplemented by 20 mL probiotic per a kilogram feed one time daily. It was found that the final body weight and daily weight gain of Sea bass in the treatment group (488.1±0.05 g and 5.07±0.19 g/day, respectively) was significantly (P<0.05) higher than the control (472.7±0.07 g. and 4.49±0.03 g/day, respectively). While, the feed conversion ratio in the treatment group (1.36±0.04) was significantly (P<0.05) lower than the control (1.53±0.32). However, survival was unaffected by treatments (P>0.05). The study indicates that using probiotics isolated from intestinal of grouper has led to better yields for Sea bass cage culture.

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย

ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้นคำว่า “โปรไบโอติก” หมายถึง จุลินทรีย์ โดยเฉพาะแบคทีเรียหรือผลิตผลจากแบคทีเรียที่ใส่ลงในระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำแล้วส่งผลให้สุขภาพของสัตว์น้ำดีขึ้น (ภวัต, 2544; Balcazar*et at.,*2006) การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในสัตว์น้ำเป็นไปด้วยเหตุผลหลายประการ เช่น เพื่อให้เกิดสมดุลในระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ เพื่อยับยั้งเชื้อก่อโรคและกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคของสัตว์น้ำ และเพื่อช่วยย่อยสารอาหารขนาดใหญ่ให้เป็นสารอาหารขนาดเล็ก (สุบัณฑิต และวีระพงศ์, 2552) โปรไบโอติกจึงเป็นผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพที่ปัจจุบัน ได้มีการประยุกต์ใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งทะเล สำหรับในประเทศไทย แม้จะพบว่ามีการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกกับอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งทะเลเป็นส่วนใหญ่ แต่พบรายงานน้อยมากในปลาทะเล

ความพยายามเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรไบโอติกสำหรับใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงปลาทะเลได้รับการพัฒนามาระดับหนึ่งในปลากะรัง (ปราโมทย์, 2556) ในการวิจัยครั้งนี้ได้นำจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่พัฒนามาจากปลากะรัง มาศึกษาต่อยอดเพื่อประยุกต์ใช้ในปลากลุ่มใกล้เคียงกัน หรือที่อยู่ในอันดับ (order) เดียวกันกับปลากะรัง และมีพฤติกรรมการกินอาหารคล้ายคลึงกันซึ่งได้แก่ปลากะพงขาว โดยคาดหวังว่าผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกที่ได้รับการพัฒนามาแล้ว ควรให้ประสิทธิภาพการใช้ใกล้เคียงกัน ผลที่ได้ไม่เพียงแต่ทำให้เกิดความเชื่อมั่นในการใช้ผลิตภัณฑ์เท่านั้น แต่ยังช่วยให้เกิดการลดต้นทุนสำหรับการสร้างผลิตภัณฑ์ตัวใหม่ ดังนั้น เพื่อความชัดเจนในประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกที่พัฒนาจากปลากะรังเมื่อมีการประยุกต์ใช้กับการเลี้ยงปลากะพงขาว จึงควรมีการทดสอบถึงประสิทธิภาพที่ได้รับจากการใช้ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกดังกล่าว หากผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่พัฒนามาจากปลากะรังนี้ ให้ผลดีในปลากะพงขาว ผลสำเร็จนี้จะเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะพัฒนาระบบการเลี้ยงปลาทะเลเชิงอุตสาหกรรมที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและผู้บริโภค

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1) ศึกษาระยะเวลาบ่มและอัตราการใช้โปรไบโอติกที่พัฒนาจากปลากะรังที่เหมาะสมเมื่อใช้เลี้ยงปลากะพงขาว
2) ทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกที่พัฒนาจากปลากะรังเมื่อใช้ในปลากะพงขาว

บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 นิยามและความหมายของโปรไบโอติก

คำว่า โปรไบโอติก (Probiotic) เป็นคำในภาษากรีก ถูกนำมาใช้เป็นครั้งแรกในรายงานการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ของ Lilly และ Stillwell ในปี ค.ศ. 1965 เพื่อกล่าวถึงสารที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งขับออกมาและช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นการทำงานที่ตรงข้ามกับยาปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่ทำลายจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด ต่อมาในปี ค.ศ.1974 Parker ได้ให้คำจำกัดความของโปรไบโอติกว่า คือสิ่งมีชีวิตที่อาจเป็น แบคทีเรีย รา โปรโตซัวยิสต์ สาหร่าย หรือ ไวรัส รวมถึงสารเคมีใดๆ ที่มีผลต่อสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ และต่อมาอีก 15 ปี Fuller (1989) ได้ให้คำจัดความที่มีความหมายเฉพาะลงไปอีกว่า โปรไบโอติก เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เติมลงไปในอาหารแล้วไปปรับปรุงสมดุลของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในลำไส้ของเจ้าบ้าน ล่าสุด Havenaar และ Veid (1992) ได้ขยายคำจำกัดความของโปรไบโอติกว่า จะต้องประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งอาจมีเพียงชนิดเดียว หรือเป็นส่วนผสมของจุลินทรีย์หลายๆชนิดที่สามารถไปปรับปรุงคุณสมบัติของจุลินทรีย์ดั้งเดิมที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์นั้นโดยจุลินทรีย์เหล่านี้อาจอยู่ในสภาพของเซลล์แห้งจากขบวนการระเหิดแห้ง (freeze-dried cells) หรืออยู่ในสภาพผลิตภัณฑ์หมัก ซึ่งนอกจากไปส่งเสริมการเจริญเติบโตแล้วยังทำให้คนและสัตว์มีสุขภาพดีขึ้นด้วย คำว่าโปรไบโอติก ไม่ใช่จำกัดการใช้เฉพาะในทางเดินอาหารเท่านั้นยังอาจไปมีผลกับระบบอื่นๆ เช่น ทางเดินหายใจส่วนต้น หรือระบบปัสสาวะ และระบบสืบพันธุ์

ตามที่กล่าวมาในเบื้องต้นเป็นความหมายของคำว่าโปรไบโอติกที่ใช้ในคนและสัตว์บกแต่เนื่องจากสัตว์น้ำอาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างจากสัตว์บกมากจึงทำให้ความหมายของโปรไบโอติกที่ใช้กับสัตว์น้ำแตกต่างออกไปบ้างโดย Moriaty (1998) ได้ให้ความหมายของโปรไบโอติกว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เติมลงในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ (water additives) แล้วมีความสามารถไปปรับสภาพของสิ่งแวดล้อมในบ่อให้ดีขึ้นด้วย แต่ Gatesoupe 1999 ได้เสนอว่าความหมายนี้ ไม่ตรงกับที่มีผู้กล่าวเอาไว้ก่อนหน้านี้จึงได้เสนอว่าโปรไบโอติก ควรหมายถึงเซลล์ของจุลินทรีย์ที่เติมลงไปโดยวิธีใดๆ แล้วสามารถเข้าไปอยู่ในลำไส้ของเจ้าบ้านและมีชีวิตอยู่ได้เพื่อพร้อมที่จะไปปรับปรุงสุขภาพของเจ้าบ้านนั้นให้ดีขึ้นขณะที่ FAO/WHO, (2001) และ Balcazar *et at.* (2006) ได้ให้ความหมายของโปรไบโอติกในทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำว่า คือจุลินทรีย์โดยเฉพาะจุลินทรีย์หรือผลผลิตจากจุลินทรีย์ที่เติมเข้าไปในระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ แล้วไปมีผลช่วยให้สัตว์น้ำมีสุขภาพดีขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากผลผลิตของสัตว์น้ำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงขึ้นอยู่กับความสมดุลของจุลินทรีย์กลุ่มที่เป็นประโยชน์และกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรค ซึ่งโปรไบโอติกที่ดีต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้น จะต้องเป็นจุลินทรีย์

สายพันธุ์ที่ก่อประโยชน์ สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ ไม่ก่อให้เกิดโรค เป็นเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่เพิ่มจำนวน และทำงานได้ดีในระบบทางเดินอาหาร (Balcazar *et al.*, 2006) รวมทั้งมีความคงทนต่อการเก็บรักษา (ภวัต, 2544)

2.2 ประโยชน์ของจุลินทรีย์โปรไบโอติกต่อการเลี้ยงสัตว์น้ำ

การผลิตอาหารโปรตีนจากสัตว์น้ำได้เกิดการขยายตัวอย่างหนักเพื่อชดเชยการขาดแคลนโปรตีนจากเนื้อสัตว์ แต่ในกระบวนการผลิตอาหารจากสัตว์น้ำในปัจจุบันทำได้ยากขึ้น เนื่องจากผลกระทบจากสภาพแวดล้อมที่เสื่อมโทรมลง ทำให้เกิดการติดโรคและการแพร่กระจายของโรคสู่สิ่งแวดล้อม นำมาซึ่งการใช้ยาปฏิชีวนะ ยากำจัดศัตรูพืช และยากำจัดโรคสัตว์น้ำ และยาเร่งการเจริญเติบโต ซึ่งสิ่งเหล่านี้ทำให้เกิดสายพันธุ์ของโรคที่ต้านทานขึ้น การนำจุลินทรีย์โปรไบโอติก โดยเฉพาะแบคทีเรียที่มีชีวิตไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวหรือหลายชนิดก็ตาม รวมทั้งผลิตภัณฑ์จากสิ่งมีชีวิต เช่น น้ำย่อยและกรดอินทรีย์ ที่เป็นประโยชน์ต่อการดำรงชีวิตของสัตว์เลี้ยงนั้นๆ เพิ่มลงในอาหารสัตว์เพื่อปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในตัวสัตว์ ซึ่งบางครั้งจะรวมเอาน้ำย่อยเติมลงในอาหารสัตว์ด้วย ลักษณะการเสริมสารโปรไบโอติก คือ การให้สัตว์ได้รับจุลินทรีย์โดยตรง ด้วยวิธีการกินจุลินทรีย์ที่ได้รับการคัดเลือกสายพันธุ์มาแล้วอย่างดี มีลักษณะการทำงานที่คงทนต่อสิ่งแวดล้อมในตัวสัตว์ ทนอุณหภูมิ และไม่มีพิษต่อสัตว์นั้นๆ (ภวัต, 2544)

จุลินทรีย์โปรไบโอติกกลายมาเป็นส่วนหนึ่งของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำซึ่งทำให้ผลผลิตในการเลี้ยงสัตว์น้ำเพิ่มขึ้นกลไกการทำงานของจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการเลี้ยงสัตว์น้ำอธิบายดังนี้

1. ยับยั้งกลุ่มแบคทีเรียก่อโรคจุลินทรีย์โปรไบโอติกส่วนใหญ่เป็นกลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรียซึ่งมีความทนต่อความเป็นกรด และทนต่อน้ำดีในระบบทางเดินอาหาร แลคติกแอซิดแบคทีเรียทำหน้าที่ในการเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสเป็นกรดแลคติก ซึ่งทำให้ภายในลำไส้มีค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง ซึ่งช่วยป้องกันการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียหลายๆ ชนิด จึงเป็นการป้องกันการเพิ่มจำนวนหรือทำลายเซลล์จุลินทรีย์ก่อโรคโดยทำให้พื้นที่ยึดครองของจุลินทรีย์ก่อโรคลดลง นอกจากนี้ยังมีวิธีอื่นๆ โดยทำให้เกิดการสร้างเมือกเคลือบผิวซึ่งจะป้องกันเชื้อก่อโรคในการยึดเกาะและการได้มาซึ่งอาหารจุลินทรีย์โปรไบโอติกจึงก่อให้เกิดประโยชน์ในด้านการช่วยย่อย หรือสร้างน้ำย่อยไปย่อยอาหารให้มีขนาดเล็ก จนสัตว์น้ำดูดซึมไปใช้ได้เร็วกว่าการย่อยอาหารตามปกติ จึงทำให้สัตว์น้ำเจริญเติบโตเร็ว อัตราแลกเนื้อดี (สุบัณฑิต และวีระพงศ์, 2552)

2. ผลิตสารยับยั้งการเป็นปรปักษ์กันแบคทีเรียเป็นปรากฏการณ์ที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ดังนั้นความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์จะเป็นกระบวนการหลักในการรักษาสมดุลระหว่างการแข่งขันของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ให้ประโยชน์และกลุ่มจุลินทรีย์ก่อโรค สารยับยั้งที่เกิดขึ้นมาจากการสังเคราะห์ทางเคมีของกลุ่มจุลินทรีย์ซึ่งมีความเป็นพิษหรือยับยั้ง และมีผลต่อกลุ่มจุลินทรีย์อื่นๆ แบคทีเรียที่มีอยู่ในลำไส้สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ โดยยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคที่อยู่ในลำไส้และในน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยยับยั้งการขยายพันธุ์ของกลุ่มจุลินทรีย์ก่อโรค (สุบัณฑิต และวีระพงศ์, 2554)

3. การเสริมระบบภูมิคุ้มกันให้ยังยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคระบบภูมิคุ้มกันในปลาและสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังมีความเหมือนกันโดยมีการทำงานร่วมกันอยู่ 2 ส่วน คือ

   1) เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีอยู่จากธรรมชาติ หรือเป็นระบบที่ไม่จำเพาะต่อการต้านทาน โดยเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์หรือของเหลวในร่างกาย

   2) เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีความจำเพาะเจาะจงโดยจะตอบสนองต่อแอนติบอดี้ และภูมิคุ้มกันภายในเซลล์จะตอบสนองทันทีโดยต่อมน้ำเหลืองจะตอบสนองทางเคมีโดยแอนติเจน (สุบัณฑิต และวีระพงศ์, 2554)

ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะจะถูกกระตุ้นด้วยจุลินทรีย์โปรไบโอติกโดยจะส่งเสริมกิจกรรมฟาโกไซโทซิสของเม็ดเลือดขาวการทำให้เกิดการกระตุ้นอย่างสม่ำเสมอต่อระบบความต้านทาน หรือภูมิคุ้มกันของตัวสัตว์น้ำ เพื่อป้องกันการติดเชื้อก่อโรคที่ติดเข้ามาทางระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ โดยเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ซึ่งจะถูกกรดที่จุลินทรีย์สร้างทำลายได้ง่าย เชื้อโรคจึงไม่สามารถอยู่ในร่างกายสัตว์น้ำได้ เพราะเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกเจริญอยู่จำนวนมาก จนเต็มพื้นที่ของระบบทางเดินอาหาร และเกิดเป็นสมดุลธรรมชาติ ทำให้สัตว์น้ำแข็งแรง (องอาจ, 2545) นอกจากนี้จากการทดสอบระบบภูมิคุ้มกันในสภาพจริงและในห้องปฏิบัติการพบว่าการใช้โปรไบโอติกไม่ว่าจะใช้เพียงชนิดเดียวหรือรวมกันหลายชนิดมีผลต่อการกระตุ้นการเกิดฟาโกไซโทซิส การสร้างไลโซโซม การสร้างพลังงานจากการหายใจ โปรไบโอติกสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในลำไส้ของปลา ด้วยการเพิ่มจำนวนของ Ig^{+} และความเป็นกรดในเม็ดเลือดขาว (Nayak, 2010)

4. ผลต่อการยับยั้งไวรัสแบคทีเรียบางชนิดมีผลต่อการยับยั้งเชื้อไวรัส แต่ยังไม่ทราบกระบวนการที่แน่ชัด (Priyadarshini *et al*., 2013)

2.3 คุณสมบัติของโปรไบโอติกที่ใช้กับสัตว์น้ำ

ด้วยเหตุผลที่สัตว์น้ำมีกลไกสำหรับลดจำนวนแบคทีเรียในลำไส้ได้ดังกล่าวข้างต้นดังนั้นการใช้โปรไบโอติกในสัตว์น้ำนั้น ต้องคำนึงถึงปริมาณของเซลล์แบคทีเรียที่มากพอ หรือเหมาะสมในการให้แต่ละครั้ง และการให้ต้องให้อย่างต่อเนื่องด้วยความถี่ที่เหมาะสม ส่วนคุณสมบัติสำคัญที่นำมาใช้สำหรับการคัดเลือกแบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในสัตว์น้ำนั้น Gatesoupe (1999) ได้รวบรวมไว้ดังนี้คือ

1) ควรเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการต่อต้านแบคทีเรียที่ก่อโรคได้ โดยอาจแสดงผลในหลอดทดลองว่ามีความสามารถในการแข่งขัน การใช้สารอาหาร หรือผลิตสาร เพื่อฆ่าหรือยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรค
2) มีความสามารถในการเกาะยึดลำไส้ได้หรือสามารถอยู่ในลำไส้ได้ชั่วระยะเวลาหนึ่ง
3) ทำให้เจ้าบ้านแข็งแรงมีความต้านทานโรคโดยมีการยืนยันผลด้วยการทดสอบการต้านทานโรค (challenge test) หรือ
4) มีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้

อย่างไรก็ตามสำหรับคุณสมบัติในการผลิตหรือไม่ผลิตสารยับยั้งในสภาพหลอดทดลองนั้นไม่ใช่คุณสมบัติที่จะนำมาใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อเป็นโปรไบโอติกได้เสมอไปเพราะว่าสารยับยั้งเหล่านี้มีด้วยกันหลายประเภทคือ antibiotics, organic acid, hydrogen peroxide และ siderophores ซึ่งการสร้างสารแต่ละชนิดเหล่านี้ของแบคทีเรียแต่ละชนิดนั้นจะขึ้นกับสภาวะที่แตกต่างกันออกไป ทั้งในสภาพหลอดทดลองและในตัวสัตว์ทดลอง

2.4 การคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติกเพื่อประโยชน์ทางการเลี้ยงสัตว์น้ำ

จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกได้มีหลายชนิด เช่น *Bacillus*, *Bifidobacteria*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Propeonibacterium* ยีสต์ และเชื้อรา (องอาจ, 2545) แต่การนำจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มาใช้เป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงสัตว์น้ำ ที่นิยมกันมากได้แก่แบคทีเรียในกลุ่ม lactic acid bacteria (LAB) เช่น *Lactoacillus sp.* *Pedioccocus sp.* แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus sp.* เช่น *B. Subtilis* และแบคทีเรียในกลุ่ม nitrifying bacteria รวมทั้ง yeast และ actinomycetes อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับการใช้แบคทีเรียเหล่านี้เป็นโปรไบโอติกในสัตว์น้ำนั้นยังมีการศึกษากันน้อยมากโดยเฉพาะการนำไปใช้ในบ่อเลี้ยง (พิกุล , 2543)

Lactobacillus จัดปีนแบคทีเรียชนิดแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ มีรูปร่างเป็นท่อนหรือกลม กระจายเป็นเซลล์เดี่ยวหรือต่อกันเป็นสาย สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นกรดแลคติคได้สูง พบทั่วไปในในสิ่งแวดล้อมรวมทั้งในอาหารหมักดอง และทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นของทั้งปลาทะเลและปลาน้ำจืด บางครั้งสามารถแยกได้จากอวัยวะภายในของปลา (สุบัณฑิตและวีระพงศ์, 2552) เชื้อ *Lactobacillus* นอกจากมีบทบาทสำคัญในอาหารหมักดองแล้ว ยังใช้เป็นอาหารเสริมในสัตว์แทนยาปฏิชีวนะ และเป็นไบโอติกในสัตว์ด้วยเช่น *L. acidophilus, L. casei* และ *L. delbruecckii* เป็นต้น บางสายพันธุ์ของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ สามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติในการต้านจุลชีพ เช่น Acidocin, Acidophilinและ Lactacin B ซึ่งสามารถควบคุมการติดเชื้อและป้องกันอาการท้องเสียในสุกรแรกเกิดได้ รวมทั้งสามารถเพิ่มอัตรารอด และยับยั้งการติดเชื้อ *Salmonella typhimurium* ในหนูทดลองได้ (ปิ่นมณี, 2546)

การคัดแยกกลุ่มจุลินทรีย์โปรไบโอติกมาใช้ประโยชน์สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ได้จากระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันได้โดยเลือกจากตัวที่แข็งแรงและมีลักษณะที่ตรงตามความต้องการ ตัวอย่างเช่น ได้มีการทดลองคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกจากระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำเพื่อนำมาคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่มีความเหมาะสมในการนำมาเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่นการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจากระบบทางเดินอาหารปลาทะเล ซึ่งพบว่าสามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ถึง 45 ไอโซเลท ซึ่งเมื่อทดสอบแล้วมี 6 ไอโซเลทที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกได้แก่ Tb11, Ma9, Mu7, BA9, BA1 และBa16 พบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถเจริญได้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ระหว่าง 2-10 และยังสามารถเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 1-5% และสามารถเจริญได้ดีในน้ำดีสังเคราะห์ที่มีความเข้มสูงถึง 0.9% นอกจากนี้ Tb11 ยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ และยังสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ (ฐิติรัตน์และนงนุช, 2555) แหล่งคัดแยกจุลินทรีย์โปรไบโอติกมีหลายแหล่งได้แก่ ลำไส้สัตว์น้ำจืด ไส้ไก่ มูลสุกร มูลวัว ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์หมักดอง จากเนื้อสัตว์และผักต่างๆ มีการทดลองคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 267 ไอโซเลท พบติดสีแกรมบวก 178 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งก้ามกราม ได้แก่ *Aeromonas sobria* และ *Vibrio algnolyticus* พบว่าเชื้อที่เจริญบนอาหาร MRS 54 ไอโซเลท มีความสามารถในการยั้งเชื้อก่อโรคกุ้งก้ามกรามได้ เมื่อทดสอบต่อโดยการทดสอบย่อยเม็ดเลือดแดง การเจริญในความเข้มข้นของเกลือ 0-10% (w/v) ความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 1-7% (w/v) ความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 2-10 และการเจริญในสภาพที่ไม่มีอากาศพบว่ามีจุลินทรีย์จำนวน LP64, LM64, LM67, Lm62-1, LM66 และ LS15 เมื่อจำแนกในระดับชนิดพบว่า LP64 และ LS15 เป็นเชื้อ *Lactobacillus plantarum* และเชื้อ LM64, LM67, Lm62-1, LM66 เป็นเชื้อ *Lactobacillus casei* (วลัยพร และคณะ, 2543) การคัดเลือกแลกติกแอซิดแบคทีเรียจากทางเดินของปลากะพงขาวที่แข็งแรงพบว่าสามารถคัดเลือกได้ 5 ไอโซเลตและ

สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลากะพงขาวได้หลังจากนั้นได้ทดสอบเลี้ยงปลากะพงขาวในตู้กระจก โดยผสมอาหารกับแต่ละไอโซเลตที่ตัดแยกได้ให้มีความเข้มข้น 10^7เซลล์/กรัมอาหาร พบว่ามีเพียง LAB-4 เท่านั้น ที่มีความสามารถในการเสริมการเจริญเติบโตของปลาและต้านโรคที่เกิดจากเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทำการทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวในกระชังโดยใช้ LAB-4 ผสมในอาหารปลาโดยใช้ความเข้มข้น 10^5 และ 10^7เซลล์/กรัมอาหาร พบว่าทุกกลุ่มทดลองมีอัตราการรอดชีวิต การเจริญเติบโตและความสามารถในการต้านโรคที่เกิดจาก *A. hydrophila* ไม่แตกต่างกัน เมื่อตรวจสอบพบ LAB-4 ในลำไส้ของปลากะพงขาวทั้งสองกลุ่มทดลองและไม่พบในกลุ่มควบคุม (ทศพร, 2543)

ในระบบทางเดินอาหารของปลากะพงขาวมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสในตับ กระเพาะ ไส้ติ่ง และลำไส้ที่มีค่าสูงที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง4-8 , 3-6, 3-6 และ 3-5 ตามลำดับ กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสมีค่าสูงในส่วนของตับที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง2 และ 6-12 ในกระเพาะอาหารมีค่าสูงที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6-9 และ 11 ในไส้ติ่ง มีค่าสูงที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 2 และ 7-9 ในลำไส้มีค่าสูงที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 2,7 และ 9-12 และค่าของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสในตับมีค่าสูงที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง 9-12 ในกระเพาะมีค่าสูงที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6 และ 8-12 ในไส้ติ่งมีค่าสูงที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 2-6 และ 9-12 ในลำไส้มีค่าสูงที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 9 และ 11 ปลากะพงขาวย่อยสารอาหารกลุ่มโปรตีนได้ดีในกระเพาะอาหารที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 2 ซึ่งเป็นกรดมาก และในลำไส้จะย่อยได้ดีที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นกลางถึงเบส ส่วนอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตและเยื่อใยจะย่อยได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3-5 ซึ่งเป็นกรดไม่มาก และที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6-9 ซึ่งเป็นเบส ส่วนสารอาหารกลุ่มไขมันจะย่อยได้ดีทั้งในช่วงที่ความเป็นกรด-ด่างเป็นกรดและเบส สรุปได้ว่าปลากะพงขาวสามารถย่อยสารอาหารประเภทไขมันและโปรตีนได้ดี (เจษฎา, 2557)

การใช้โปรไบโอติกพบว่าทำให้มีผลต่อการควบคุมโรค และเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง โปรไบโอติกนั้นไม่ได้มีเพื่อเป็นภูมิคุ้มกันให้กับปลาตั้งแต่กำเนิด ดังนั้นจึงมีการให้เสริมเพื่อให้ปลามีความสามารถต้านทานต่อโรค และนิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง การเสริมโปรไบโอติกในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้นจะช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำทำให้สุขภาพของสัตว์น้ำดีขึ้น กินอาหารพอดีไม่มากไม่น้อย ทนต่อความเครียดและต้านทานต่อสภาวะต่างๆที่ไม่เหมาะสม และยังช่วยปรับปรุงคุณภาพน้ำให้ดีขึ้นด้วย การให้โปรไบโอติกแก่สัตว์น้ำต้องให้อย่างสม่ำเสมอ โปรไบโอติกมีผลต่อการเสริมระบบภูมิคุ้มกัน โดยพบว่าโปรไบโอติกมีประสิทธิภาพในการโอบกินเชื้อโรคในบริเวณที่มีการอักเสบก่อนการทำงานของแอนตี้บอดี้ในการกำจัดแบคทีเรีย ซึ่งเป็นบทบาทสำคัญในการต้านเชื้อแบคทีเรียแก่ปลาและ หอยหลายๆ ชนิด (Mai D. I., 2013) ปริมาณของโปรไบโอติกที่ขายในท้องตลาดที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกมีจำนวนจุลินทรีย์อยู่ระหว่าง 10^6-10^9 เซลล์ต่อปริมาตร 1 ซีซี (องอาจ, 2545)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวกับประสิทธิภาพของการใช้โปรไบโอติกในการเลี้ยงสัตว์น้ำ

การนำโปรไบโอติกมาประยุกต์ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้น ได้เริ่มมาไม่นานนักเมื่อเทียบกับการประยุกต์ใช้ในคนและสัตว์บกที่เลี้ยง (Iriantoand Austin, 2002; Rinkinen *et at*., 2003) ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีการเติมแบคทีเรียแลกติก ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกเติมลงในอาหาร เพื่อให้ระบบทางเดินอาหารหรือร่างกายของสัตว์น้ำทำงานปกติ ส่งผลให้สัตว์น้ำมีการเจริญเติบโตดี ตัวอย่างรายงานวิจัยผลการเสริมโปรไบโอติกในอาหารเลี้ยงสัตว์น้ำและช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและช่วยสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่สัตว์น้ำ มีดังนี้

ปวเรศวร์ และคณะ (2549) นำโปรไบโอติกสายพันธุ์ต่างๆ คือ *Aeromonas sobria* และ *Vibrio alginolyticus* มาทดสอบความเหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อโรคของกุ้งก้ามกราม พบว่ามีแบคทีเรียแลคติก 22 สายพันธุ์ ที่สามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ โดยเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 22 สายพันธุ์เป็น *Lactobacillus plantarum* และเมื่อทดสอบความเหมาะสมในการใช้เป็นโปรไบโอติก พบมี 6 สายพันธุ์ จึงคัดเลือกไว้ 2 สายพันธุ์คือ TISTR 541 และ TISTR 543 แล้วนำมาทดลองผสมอาหารกุ้งสูตรที่ 1 สูตรที่ 2 และกลุ่มควบคุม ใช้เลี้ยงกุ้งก้ามกรามพบว่าความยาวเฉลี่ยและอัตราการรอดของกุ้งในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกันทางสถิติ และการเก็บรักษาอาหารกุ้งผสมโปรไบโอติกโดยกำหนดให้ปริมาณแบคทีเรียแลคติกที่เหลือในอาหารต้องเหลือในอาหารไม่น้อยกว่า 10^7 CFU/กรัมอาหาร พบว่าอาหารกุ้งผสมโปรไบโอติกทั้งสองสูตรสามารถคงคุณภาพได้นาน 5 วัน ในอุณหภูมิปกติ และเก็บได้นาน 45 วัน ที่อุณหภูมิตู้เย็น (12-13 $^{\circ}$C)

ผลการใช้จุลินทรีย์อีเอ็มมาใช้เป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงปลาโมง โดยมี 5 ชุดการทดลอง โดยชุดที่ 1 และ 2 นำมาจุลินทรีย์อีเอ็มผสมกับอาหารก่อนอัดเม็ดในอัตรา 10 และ 20% ของอาหารตามลำดับ และชุดที่ 3 และ4 ใช้อาหารอัดเม็ดคลุกจุลินทรีย์อีเอ็มในอัตรา 5 และ 10% ของอาหารตามลำดับ และชุดที่ 5 ชุดควบคุม ทำการทดลองเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า น้ำหนักตัวเฉลี่ย น้ำหนักเพิ่มเฉลี่ย น้ำหนักตัวเพิ่มต่อวัน อัตราการรอดตาย และอัตราการแลกเนื้อ ของปลาโมงไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังนั้นจึงสรุปว่าการใช้อีเอ็มเป็นโปรไบโอติกไม่มีผลต่ออัตราการเจริญและอัตราการรอดตายของสภาวะการเลี้ยงปลาโมงขนาดเล็กที่ความหนาแน่นต่ำที่มีการจัดการอาหารและคุณภาพน้ำที่ดี (รัตนสุดา, 2554)

การทดลองใช้ *Bacillus* spp. พันธุ์ที่แยกจากตัวกุ้ง ในการเลี้ยงกุ้งในบ่อดิน โดยการผสมอาหารให้กินเมื่อกุ้งอายุ 40 วัน พบว่า น้ำหนักและความยาวกุ้ง จะมากกว่ากุ้งที่ไม่ใช้จุลินทรีย์ และมีอัตรารอดร้อยละ 76 ในขณะที่กุ้งกลุ่มที่ไม่ใช้โปรไบโอติกมีอัตรารอดร้อยละ 65 (Rengpipat, 2000)

Devaraja *et al*. (2002) ทำการศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์โปรไบโอติกจาก 2 ผลิตภัณฑ์ แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุดได้แก่ ชุดควบคุม (ไม่ใช้ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก) ชุดการทดลองที่ 2 ใช้

จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่มี *Bacillus* spp. และ *Nitrobacter* spp. ประกอบในผลิตภัณฑ์ ชุดการทดลองที่ 3 ใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่มี *Bacillus* spp. *Nitrosomonas* spp. และ *Nitrobacter* spp. ประกอบในผลิตภัณฑ์ แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ ผลการทดลองพบว่า การใช้ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกที่มี *Bacillus* spp. และ *Nitrobacter* spp. เท่านั้นที่ให้ผลผลิตกุ้งที่ได้สูงกว่าชุดควบคุม

Venkat *et al*. (2004) ได้ผสมแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* ในอาหารของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ระยะโพสลาวาจำนวน 300 ตัวที่มีขนาดน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นระหว่าง 114-118 มิลลิกรัม ให้กุ้งกินเป็นเวลา 60 วัน ผลพบว่า โปรไบโอติกมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบที่พบในทางเดินอาหารกุ้งก้ามกราม ส่งผลให้การเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามที่ได้รับโปรไบโอติกมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก

จากงานวิจัยของ Gullian *et al.* (2004) พบว่าการเติมโปรไบโอติกที่เตรียมขึ้นจากแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. มีคุณสมบัติช่วยให้การเจริญเติบโตและสร้างภูมิคุ้มกันโรคได้เป็นอย่างดี ส่วนการเติมโปรไบโอติกที่เตรียมขึ้นจากแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ส่งเสริมการเจริญเติบโตเพียงอย่างเดียว

EL-Haroun *et al*. (2006) ศึกษาผลของการใช้ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกซึ่งประกอบด้วย *Bacillus licheniformis* และ *B. Subtilis* ต่ออัตราการเติบโตของปลานิล โดยใช้ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกดังกล่าวภายหลังผสมอาหารเลี้ยงปลานิลที่มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยเริ่มต้นระหว่าง 22.96-26.4 กรัมเป็นเวลา 120 วัน ผลพบว่า ปลานิลในกลุ่มที่ใช้ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกดังกล่าว มีอัตราการเติบโตสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Aly *et al*. (2008) ศึกษาผลของการนำ *B. pumilus* ซึ่งแยกเชื้อจากต่อมเพศ (gonad) ของปลานิลมาผสมในอาหารปริมาณ 1×10^{6} CFU/มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กรัมเลี้ยงปลานิลน้ำหนักเริ่มต้น 6.5 กรัมเป็นเวลา 2 เดือนผลพบว่าอัตราการเติบโตของปลานิลในกลุ่มที่ใช้โปรไบโอติกสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Son *et al*. (2009) ทดลองเลี้ยงปลากะรังดอกแดง (*Epinephelus coioides*) ด้วยอาหารที่ผสมโปรไบโอติกที่มีแบคทีเรียชนิด *Lactobacillus plantarum* ในอัตรา 10^{8}CFU ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและค่าประสิทธิภาพการให้อาหาร มีค่าสูงขึ้นจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง รวมถึงอัตรารอดสูงกว่าชุดควบคุมเช่นกัน และเมื่อหยุดให้โปรไบโอติกแบคทีเรียดังกล่าวจะลดลงไปมากจากลำไส้ภายในเวลา 1 สัปดาห์

Sun *et al*. (2010) พบว่าเมื่อใช้ *B. pumilus* ซึ่งแยกจากทางเดินอาหารของของปลากระรังจุดส้ม (*Epinephelus coioides*) เป็นโปรไบโอติกผสมในอาหารปริมาณ 1×10^{7} CFU/มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กรัมเลี้ยงปลากระรังจุดส้มที่มีน้ำหนักตัวเริ่มต้นเฉลี่ย 45 กรัมเป็นเวลา 2 เดือนพบว่าอัตรา

แลกเนื้อ (FCR) ของปลาในกลุ่มที่ใช้โปรไบโอติกต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและยังสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้อีกด้วย

การได้รับโปรไบโอติกชนิด *Lactobacillus rhamnosus* ที่จำนวนเชื้อ 2.8 X 10^{8} CFU/กรัมอาหาร พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการเพิ่มขึ้นของภูมิคุ้มกันในปลาเทร้าส์ (Nayak, 2010)

2.6 การสร้างผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก

โปรไบโอติกได้ถูกพัฒนาให้มีหลายรูปแบบ ได้แก่ แบบน้ำและแบบผง ซึ่งมีอัตราการใช้ทั่วไปอยู่ที่ 10-20 ซีซีต่ออาหาร 1กิโลกรัม และ 5-10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ตามลำดับผลิตภัณฑ์ทั้งในรูปแบบผงและน้ำที่จำหน่ายในตลาด พบมีจำนวนจุลินทรีย์อยู่ระหว่าง 10^{6}-10^{9} เซลล์ต่อมิลลิลิตร (องอาจ, 2545) ผลิตภัณฑ์จากโปรไบโอติกพบว่ายิ่งอายุการเก็บรักษานานขึ้นปริมาณของจุลินทรีย์โปรไบโอติกมีแนวโน้มลดลงเนื่องจากเมื่อระยะเวลาผ่านไปค่าความเป็นกรด-ด่างในผลิตภัณฑ์ลดลงทำให้จำนวนจุลินทรีย์ลดลง ดังเช่นในการทดสอบผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเมื่อระยะเวลาผ่านไป 5 สัปดาห์ พบว่าเมื่อเริ่มต้นมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ 10^{7}-10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตรเมื่อเวลาผ่านไป 5 สัปดาห์มีปริมาณเชื้อเหลือเพียง 10^{3} เซลล์ต่อมิลลิลิตรซึ่งเกิดจากค่าความเป็นกรด-ด่างที่ลดลงจาก 4.07 เหลือ 3.80 (Nagendra *et al.*,1995) การมีชีวิตอยู่ของโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์เป็นสิ่งสำคัญเนื่องจากโปรไบโอติกที่มีชีวิตจะสามารถก่อตัวและเพิ่มจำนวนในลำไส้ และให้ประโยชน์ต่อสุขภาพผู้ให้อาศัย โดยอัตราการรอดของโปรไบโอติกขึ้นกับหลายปัจจัยทั้งภายในและภายนอกได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ค่าความเป็นกรด-ด่าง สายพันธุ์จุลินทรีย์ ระยะเวลาที่เก็บเกี่ยวจุลินทรีย์ ภาชนะที่ใช้บรรจุผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษา จึงได้มีการคิดค้นวิธีเพื่อที่จะรักษาอัตรารอดจุลินทรีย์โปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีต่างๆ เช่น การห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกโดยเทคนิคไมโครเอนแคป-ซูเลชั่น (สิรสา, 2556) ใน International Diary Federation (IDF) กำหนดให้ผลิตภัณฑ์เสริมโปรไบโอติกมีจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอย่างน้อย 10^{7} CFU/มิลลิลิตร จนกระทั่งวันบริโภค (สิรสา, 2556 อ้างโดย Ouwehand and Salminen, 1998) และในหลายประเทศได้กำหนดให้จำนวนจุลินทรีย์โปรไบโอติกขั้นต่ำอยู่ที่ 10^{6} CFU /มิลลิลิตร เช่นประเทศอาร์เจนติน่า บราซิล อุรุกวัย และปารากวัย (สิรสา, 2556 อ้างโดย Kresaekoopt *et al.*, 2003)

โดยทั่วไปการสร้างผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกจากแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* นับเป็นเรื่องยุ่งยาก เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องการอาหารที่มีองค์ประกอบค่อนข้างซับซ้อนและการเก็บรักษาให้มีจำนวนและคุณภาพคงเดิมทำได้ยาก แต่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งใช้วิธีแบบภูมิปัญญาชาวบ้านเพิ่มปริมาณ *Lactobacillus* เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกในบ่อเลี้ยงกุ้งกลับเป็นวิธีที่ให้ผลที่ดีกว่า และมีต้นทุนต่ำ โดยการนำหัวเชื้อ (starter) ของแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* ไปหมักกับกากน้ำตาลที่เจือจางด้วย

น้ำประปาให้เป็น 0.5-5 % พร้อมกับเติมอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งลงไปประมาณ 2% หมักทิ้งไว้ 24-48 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นว่าน้ำที่ได้จะมีสีเหลืองนวลมีกลิ่นหอมออกเปรี้ยวซึ่งมีเชื้ออยู่ประมาณ 5×10^{7}- 5×10^{8}เซลล์ต่อ 1 มิลลิลิตร ทั้งนี้การหมักจะให้หรือไม่ให้อากาศก็ได้เนื่องจาก *Lactobacillus* จะใช้อากาศเพียงเล็กน้อยในการเจริญ แต่ถ้าหากต้องการหมักเชื้อในปริมาณที่มากก็ควรมีการให้อากาศด้วย เชื้อที่หมักได้นี้จะค่อนข้างบริสุทธิ์ เนื่องจากเชื้อจะเปลี่ยนกากน้ำตาลให้เป็นกรดซึ่งกรดนี้จะไปยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มอื่นไม่ให้เจริญได้แต่ทั้งนี้ต้องมีการจัดการที่สะอาดพอสมควร และหัวเชื้อที่ใช้ควรต้องบริสุทธิ์และมีปริมาณของแบคทีเรียต่อกรัมที่มากพอการนำเชื้อที่หมักมาใช้อาจนำไปผสมกับอาหารพอชื้นแล้วนำไปให้กุ้งกินหรือนำไปเทลงบ่อได้โดยตรงแต่ปริมาณที่ใส่ลงไปในบ่อต้องไม่มากจนเกินไป ซึ่งจะไปมีผลกับความเป็นกรด-ด่างของน้ำในบ่อเลี้ยง สำหรับความถี่ในการให้ถ้าใช้วิธีคลุกอาหารอาจให้ทุกวันๆ ละ 1 ครั้งส่วนการใส่บ่ออาจเป็น 2 สัปดาห์ต่อครั้ง หรือทุก 10 วันเนื่องจากเชื้อชนิดนี้สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในน้ำทะเลที่ความเค็ม 15 psu นานประมาณ 10 วัน แต่ทั้งนี้ทั้งนั้นอาจขึ้นกับชนิดของเชื้อด้วย ซึ่งแต่ละชนิดจะทนความเค็มได้ที่ระดับต่างๆ กัน นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* สามารถมีชีวิตอยู่ภายในลำไส้กุ้งได้หลายวันและตรวจพบว่ายังมีชีวิตได้ในขี้กุ้งด้วย ถ้าหากต้องการทราบว่ากุ้งในบ่อได้รับแบคทีเรีย *Lactobacillus* หรือไม่อาจรวบรวมขี้กุ้งจากยอมาใส่ในขวดที่สะอาดแล้วเติมกากน้ำตาล หรือนมลงไปตั้งทิ้งไว้สัก 1 วันเมื่อดมกลิ่นดูจะพบว่าถ้ามีเชื้อ *Lactobacillus* จะได้กลิ่นค่อนข้างหอมออกเปรี้ยว แต่ถ้าไม่มี *Lactobacillus* แล้วจะมีกลิ่นเหม็นมาก ดังนั้นจึงเห็นได้ว่า แบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* สามารถที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในสัตว์น้ำได้อย่างปลอดภัยแม้ว่าจะไม่ใช่แบคทีเรียที่พบตามธรรมชาติในลำไส้กุ้งก็ตาม (พิกุล, 2543)

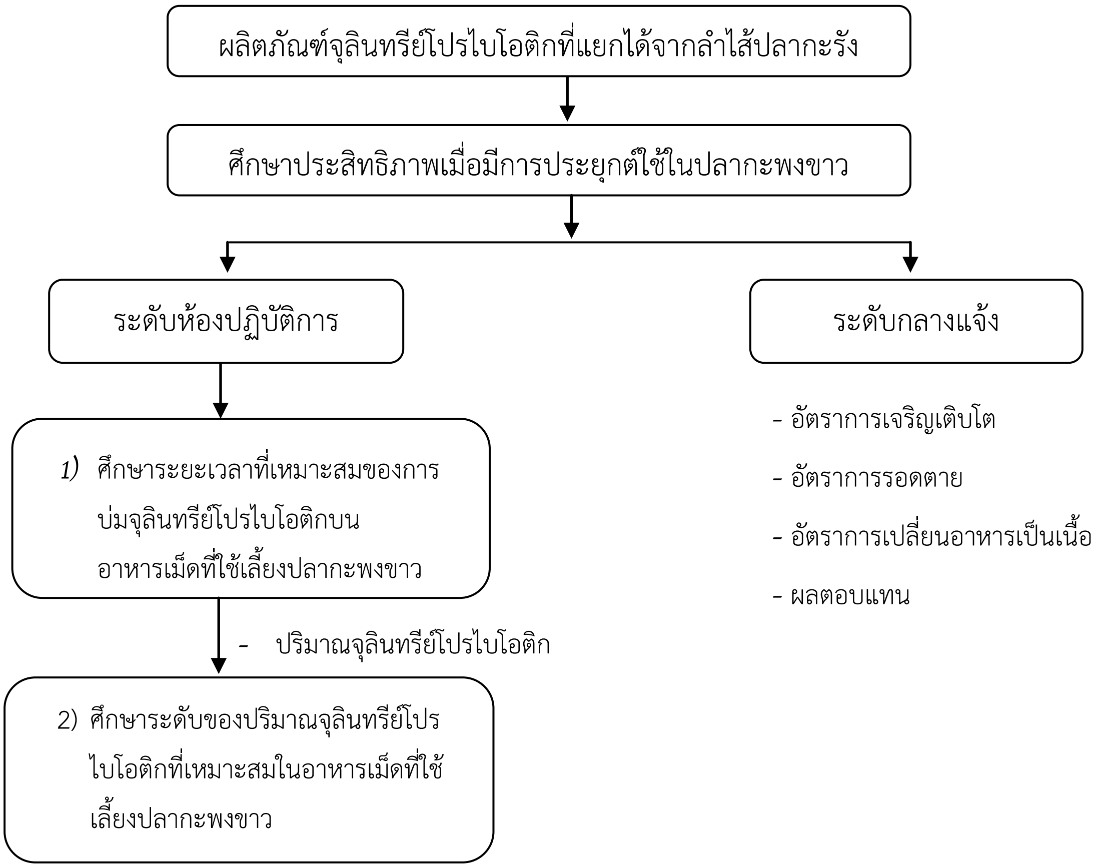
การใช้แบคทีเรียสกุลอื่นเป็นโปรไบโอติกในสัตว์น้ำนั้นต้องคำนึงถึงความปลอดภัยต่อคนและสิ่งแวดล้อม และปัญหาที่จะตามมาด้วย ยกตัวอย่างเช่นแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตสารออกมายับยั้งหรือฆ่าแบคทีเรียต่างชนิดกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ควรที่จะมีการพิสูจน์และยืนยันให้ได้ว่าสารที่ผลิตขึ้นนั้นต้องไม่เป็นพิษกับผู้ที่บริโภคเสียก่อนโดยเฉพาะแบคทีเรียที่อยู่ในภาพของสปอร์ (spore) เช่นในกลุ่ม *Bacillus sp.* เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าแบคทีเรียที่อยู่ในสภาพของสปอร์นี้จะมีความทนทานต่ออุณหภูมิสูงและรังสีได้ซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายได้เมื่อผู้บริโภคได้รับเชื้อปนเปื้อนไปกับตัวสัตว์น้ำ หรืออาจไปมีผลกับนิเวศวิทยาของสิ่งแวดล้อมต่อไป เพราะการใช้แบคทีเรียในบ่อเลี้ยงนั้นจะต้องใช้เป็นจำนวนมากและยังมีน้ำเป็นสื่อในการพาแบคทีเรียออกไปได้กว้างไกลด้วยแต่เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตสารและเอนไซม์ต่างๆในการย่อยสลายของเสียได้และสามารถเก็บรักษาได้ง่ายและเป็นเวลานานเมื่ออยู่ในภาพผลิตภัณฑ์จึงมีการนำเชื้อกลุ่มนี้มาผลิตเป็นสินค้าโปรไบโอติกกันมาก อย่างไรก็ตามการนำผลิตภัณฑ์ของแบคทีเรียในภาพของสปอร์ไปใช้โดยตรงอย่างทันทีนั้นอาจทำให้ประสิทธิภาพไม่ดีเท่าที่ควรเนื่องจากสปอร์ต้องใช้ระยะเวลาหนึ่งในการงอกเป็นเซลล์คือประมาณ 3-5 ชั่วโมงในสภาพที่เหมาะสมและลำไส้ของกุ้งค่อนข้างสั้นซึ่งอาจทำให้เชื้อถูกขับออกมาเสียก่อนที่จะ

ทำหน้าที่ได้อย่างเต็มที่ภายในลำไส้ดังนั้นบางผลิตภัณฑ์จึงมีการแนะนำให้นำแบคทีเรียที่อยู่ในรูปของสปอร์มาทำการกระตุ้นให้งอกเป็นเซลล์หรือที่เรียกว่าการ activate เชื้อ ก่อนที่จะนำไปใช้เพื่อให้เชื้อพร้อมที่จะทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพทันที แต่การ activate เชื้อนี้ต้องมีความระมัดระวังสูงในเรื่องของความสะอาดเพราะอาจมีการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆก่อนที่จะมีการงอกของสปอร์ได้ (พิกุล, 2543)

บทที่ 3
ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 แผนการดำเนินการวิจัย

การศึกษาเพื่อการประยุกต์ใช้โปรไบโอติกสำหรับเพิ่มผลผลิตในการเลี้ยงปลากะพงขาวเชิงอุตสาหกรรมนี้ มีแผนการปฏิบัติเป็นลำดับขั้นตอน ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ลำดับขั้นตอนดำเนินการวิจัย

3.2 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการบ่มจุลินทรีย์โปรไบโอติกบนอาหารเม็ดที่ใช้เลี้ยงปลากะพง

การบ่มเชื้อบนอาหาร เป็นขั้นตอนหนึ่งของการกระตุ้นและปรับสภาพจุลินทรีย์โปรไบโอติกขณะอยู่บนอาหารก่อนนำไปเลี้ยงปลากะพงขาว ปริมาณเชื้อที่เพิ่มขึ้นบนอาหารในช่วงระยะการบ่มต่างๆ จะ

แสดงให้เห็นถึงช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมของการปรับตัวและการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่แยกได้จากลำไส้ปลากะรังในอาหารที่ใช้เลี้ยงปลากะพงขาว โดยเมื่อใช้ผสมอาหารให้ปลากะพงขาวกิน อาจส่งผลให้ปลามีอัตราการรอดตายสูงขึ้นและมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้นได้ การศึกษานี้ได้ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely Randomize Design; CRD ซึ่งมีระยะเวลาการบ่มเป็นปัจจัยหลักที่ศึกษา และมีปริมาณจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่มีชีวิตภายหลังการบ่มที่ระยะเวลาต่างๆ เป็นพารามิเตอร์ที่ตรวจสอบ รายละเอียดของวิธีการศึกษาอธิบายเป็นลำดับขั้นตอนดังนี้

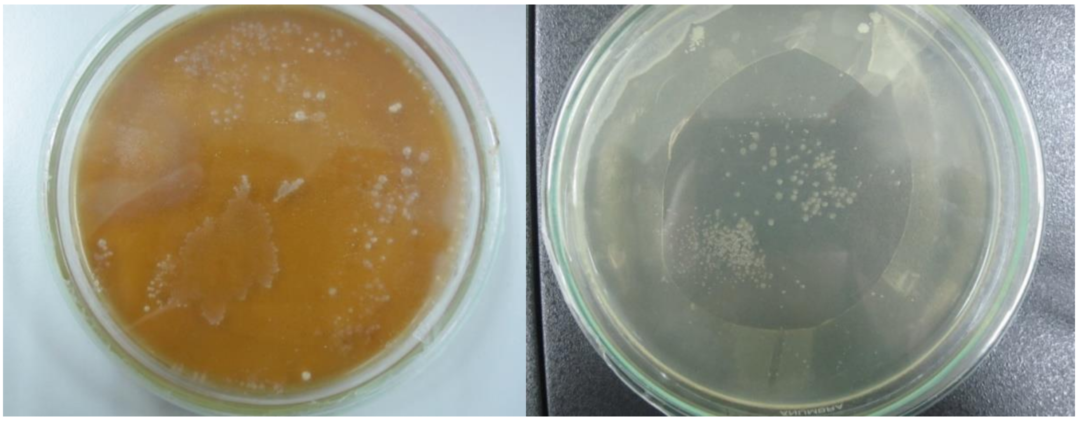
1) ชั่งอาหารเม็ดทดลอง 10 กรัม ใส่ในจานแก้วพร้อมฝาปิด จำนวน 15 ชุด จากนั้นฉีดพ่น (spray) จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่แยกได้จากลำไส้ปลากะรังซึ่งอยู่ในภาพของเหลวลงบนอาหารเม็ดที่เตรียมไว้ในระดับปริมาณหัวเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติก: อาหาร เท่ากับ 33.33 มิลลิลิตร: 1 กิโลกรัม การฉีดพ่นเชื้อ ทำในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นบ่มไว้ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน ดังนี้ 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที แต่ละเวลาทำ 3 ซ้ำ

2) เมื่อครบเวลาของการบ่มตามที่กำหนด นำอาหารที่บ่มเชื้อแล้วไปเจือจางลำดับส่วนในสารละลายเปบโตนความเข้มข้น 0.1% ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดภาพชมพู่ ผสมให้เข้ากันบนเครื่องกวนสาร (vortex mixer) ได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:100 หลังจากนั้นเจือจางต่อไปจนความเข้มข้นสุดท้ายมีความเข้มข้น 1:1,000,000

3) นำสารละลายเจือจางเชื้อ ข้อ 2) โดยดูดสารละลายในแต่ละระดับการเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มากระจายเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.5% ด้วย spreader glass หรือ spread plate technique (Nancy *et at*., 1960) หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนับจำนวนจุลินทรีย์ที่เป็น *Lactobacillus plantarum* โดยสังเกตจากโคโลนีที่มีลักษณะทรงกลมสีค่อนข้างขาวขุ่นขอบเรียบ โคโลนีนูนขึ้นเกือบครึ่งวงกลม

4) นำสารละลายเจือจางเชื้อ ข้อ 2) โดยดูดสารละลายในแต่ละระดับการเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มากระจายเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PCA (plate count agar)ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.5% ด้วย spreader glass หรือ spread plate technique (Nancy *et al*., 1960) หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 2)

5) การวิเคราะห์ทางสถิติใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (One way analysis of variance) พร้อมทั้งเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณจุลินทรีย์มีชีวิตที่เกิดขึ้นตามวิธีการ LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์การวิเคราะห์ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS



ภาพที่ 2 ลักษณะการเจริญของเชื้อโปรไบโอติก (*Lactobacillus plantarum*) บนอาหารสูตร MRS (ซ้าย) และ PCA (ขวา)

3.3 การศึกษาระดับปริมาณจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่เหมาะสมต่ออาหารที่ใช้เลี้ยงปลา

การศึกษาระดับปริมาณจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่เหมาะสมต่ออาหารที่ใช้เลี้ยงปลา มีวัตถุประสงค์เพื่อหาปริมาณการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกซึ่งแยกได้จากปลากะรังที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงปลากะพงขาว โดยใช้ระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมซึ่งได้ผลจากการศึกษาในข้อ 3.2 เป็นเกณฑ์ การศึกษานี้ใช้แผนการทดลองแบบ CRD โดยมีระดับปริมาณจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่แตกต่างกัน 4 ระดับ เป็นปัจจัยหลักของการศึกษา และมีการเจริญเติบโต การรอดตาย อัตราแลกเนื้อ และปริมาณของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารเป็นพารามิเตอร์ที่ตรวจสอบโดยรายละเอียดของการทดลองอธิบายเป็นลำดับขั้นดังนี้

1) การเตรียมบ่อทดลองบ่อที่ใช้ในการทดลองเป็นบ่อผ้าใบทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เมตร จำนวน 15 บ่อ การออกแบบบ่อทดลองให้มีระบบน้ำหมุนเวียนและมีการบำบัดน้ำผ่านบ่อบำบัดทางชีวภาพ (biological filtration) (ภาพที่3) เติมน้ำความเค็มน้ำ 20 psu เข้าบ่อให้มีปริมาตร 1.8 ตันเท่ากันทุกบ่อ ติดตั้งระบบให้อากาศเพิ่มเติมผ่านหัวทราย บ่อละ 2 หัว ทำการเดินระบบกรองชีวภาพเป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อนการทดลอง และตรวจสอบคุณภาพน้ำก่อนปล่อยปลาทดลอง

ภาพที่ 3 บ่อผ้าใบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เมตรที่ใช้ในการทดลอง

2) การทดลองเลี้ยงปลา ปล่อยลูกปลากะพงขาวขนาดความยาวลำตัวเริ่มต้นเฉลี่ย 4.89±0.08 เซนติเมตร น้ำหนักเฉลี่ย 1.97±0.29 กรัมสุขภาพแข็งแรงและได้รับการฝึกให้รับอาหารเม็ดได้เป็นอย่างดีแล้วจากฟาร์มเอกชน จำนวน 2,400 ตัว ในอัตรา 300 ตัวต่อบ่อ และสุ่มให้ปลาทดลองในแต่ละบ่อได้รับอาหารตามชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ ดังนี้

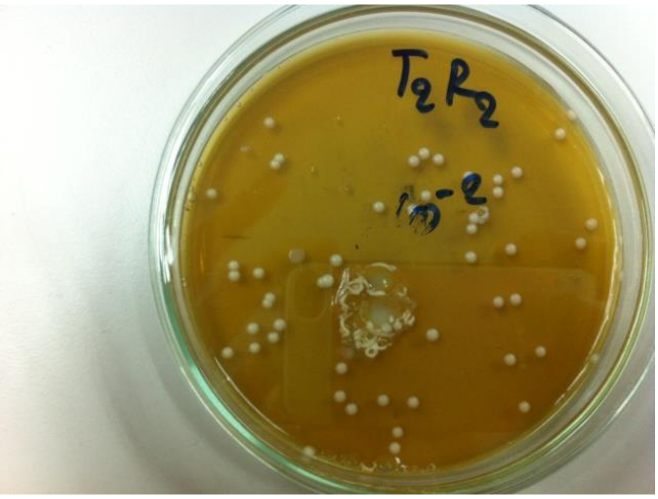
- ชุดการทดลองที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่เสริมเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหาร)
- ชุดการทดลองที่ 2 เสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหารด้วยอัตรา 10 มิลลิลิตร :อาหาร 1 กิโลกรัม
- ชุดการทดลองที่ 3 เสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหารด้วยอัตรา 20 มิลลิลิตร :อาหาร 1 กิโลกรัม
- ชุดการทดลองที่ 4 เสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหารด้วยอัตรา 30 มิลลิลิตร :อาหาร 1 กิโลกรัม

3) อาหารที่ใช้ในการทดลอง คืออาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับปลาทะเล เปอร์เซ็นต์โปรตีนเฉลี่ย 45 เปอร์เซ็นต์ กำหนดการให้อาหารปลาทดลองแบบกินจนอิ่มวันละ 2 ครั้ง (08.00 น.และ 16.30 น.) การเสริมจุลินทรีย์ทำวันละ 1 ครั้งในมื้อเย็น โดยการฉีดพ่นจุลินทรีย์โปรไบโอติกซึ่งมีสภาพเป็นของเหลวให้กระจายสม่ำเสมอบนอาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ใช้เลี้ยงปลาทดลอง และปิดฝาบ่มเป็นเวลา 30 นาทีก่อนนำไปให้ปลาทดลองกิน ใช้ระยะเวลาในการศึกษา 56 วัน บันทึกปริมาณอาหารที่ใช้จริงของแต่ละบ่อ

4) การจัดการคุณภาพน้ำระหว่างการทดลองเลี้ยงปลา ทำการดูดตะกอนทุกวันๆ ละ 1 ครั้ง ในตอนเช้าก่อนให้อาหาร เปลี่ยนผ้ากรองของเสียที่อยู่ในระบบกรองชีวภาพทุกวัน เปลี่ยนถ่ายน้ำร้อยละ

50 ของปริมาตรน้ำในบ่อทุกๆ 10 วัน ตรวจวัดคุณภาพน้ำด้านอุณหภูมิทุกวันตลอดการทดลอง และตรวจวัดคุณภาพน้ำอย่างละเอียด (ความเค็ม ปริมาณออกซิเจน ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำ ค่าความเป็นด่างของน้ำ ปริมาณไนไตร์ท และแอมโมเนีย) สัปดาห์ละหนึ่งครั้ง

5) การตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของปลากะพงขาวด้วยวิธี spread plate (Nancy *et al*, 1960)บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS และ PCA โดยการสุ่มตัวอย่างปลากะพงในแต่ละชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ มาผ่าและแยกระบบทางเดินอาหารให้ได้น้ำหนัก 1 กรัม นำทางเดินอาหารที่ได้ไปตีผสมในสารละลายเปบโตนความเข้มข้น 0.1%ด้วยเครื่อง stomacher ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อแยกเชื้อ จากนั้นนำสารละลายเชื้อมาเจือจางลง (dilution) ครั้งละ 10 เท่า แล้วนำความเข้มข้นที่ต้องการมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี spread plate ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ เมื่อทำการแยกเชื้อเรียบร้อยแล้วทำการบ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อ (incubator) เป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงทำการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารทั้งสองชนิด (ภาพที่ 4 และ 5) โดยการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อทั้งหมด ในแต่ละความเข้มข้นแล้วหาค่าเฉลี่ย (CFU)



ภาพที่ 4 ลักษณะการเจริญของเชื้อโปรไบโอติก (*L. plantarum*) ที่คัดแยกได้จากลำไส้ปลากะพงขาวบนอาหารสูตร MRS

ภาพที่ 5 ลักษณะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่คัดแยกได้จากลำไส้ปลากะพงขาวบนอาหารสูตร PCA

6) ใช้เวลาทดลองเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ทำการเก็บข้อมูลเมื่อสิ้นสุดการทดลองโดยบันทึกข้อมูลดังต่อไปนี้

(1) น้ำหนักตัวเฉลี่ยเป็นน้ำหนักของปลา (กรัมต่อตัว)ของปลาในแต่ละหน่วยทดลอง

(2) น้ำหนักเพิ่มเฉลี่ยเป็นน้ำหนักของปลาเพิ่มต่อตัวของปลาในแต่ละหน่วยทดลอง

(3) น้ำหนักตัวเพิ่มต่อวัน (average daily weight gain, ADG) (กรัม/ตัว/วัน)

$$= \frac{\text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง-น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}}{\text{จำนวนวันที่ใช้ทดลอง}}$$

(4) เปอร์เซ็นต์การรอดตาย (survival rate) (เปอร์เซ็นต์)

$$= \frac{\text{จำนวนปลาที่เหลือรอดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} \times 100}{\text{จำนวนปลาที่ปล่อยเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}}$$

(5) อัตราการแลกเนื้อ (Food conversion ratio, FCR)

$$= \frac{\text{น้ำหนักรวมของอาหารทั้งหมดที่ปลากินในแต่ละหน่วยทดลอง (กิโลกรัม)}}{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลาทดลองในแต่ละหน่วยทดลอง (กิโลกรัม)}}$$

(6) ปริมาณจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของปลา (เก็บข้อมูลทุกสัปดาห์)

7) การวิเคราะห์ทางสถิติใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (One way analysis of variance) พร้อมทั้งเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวน้ำหนักเพิ่มน้ำหนักเพิ่มต่อวันอัตราการรอดตายและอัตราการแลกเนื้อตามวิธีการ LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์การวิเคราะห์ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

3.4 การศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่แยกได้จากลำไส้ปลากะรังเพื่อการเลี้ยงปลากะพงขาวในกระชัง

การศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่แยกได้จากลำไส้ปลากะรังเมื่อใช้เลี้ยงปลากะพงขาวในกระชัง เป็นการศึกษาเพื่อให้เกิดความมั่นใจในการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่แยกได้จากลำไส้ปลากะรัง โดยการทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวขนาด 5 นิ้วให้เป็นขนาดตลาด (น้ำหนักมากกว่า 500 กรัม) ในกระชังที่แขวนลอยอยู่ในบ่อดินขนาด 2 ไร่ น้ำในบ่อลึกเฉลี่ย 1.5 เมตร ซึ่งในบ่อจะมีการติดตั้งใบพัดตีน้ำจำนวน 1 ชุดสำหรับการตีผสมน้ำกรณีที่ฝนตกหนัก รายละเอียดของวิธีการทดลองอธิบายเป็นลำดับดังนี้

1) การเตรียมกระชังและการติดตั้งกระชัง กระชังที่ใช้ในการทดลองเป็นกระชังอวนโพลีขนาด 4x4x1.5 เมตร มีขนาดตาอวน 3 เซนติเมตร จำนวน 6 กระชัง ซึ่งมีการติดตั้งแบบขึ้นลงตามน้ำได้ กำหนดแนวการวางกระชังตามทิศทางของลม โดยกำหนดให้กระชังชุดทดลอง (ชุดที่มีการเสริมโปรไบโอติก) วางอยู่ในแนวใต้ลม เพื่อป้องกันไม่ให้โปรไบโอติกอาจละลายและลอยตามลมไปสู่กระชังชุดควบคุมได้ ทุกกระชังมีการติดตั้งกรอบให้อาหารและระบบให้อากาศไว้ใต้กระชังทุกกระชัง (ภาพที่ 6)

ภาพที่ 6 การติดตั้งกระชังเลี้ยงปลาทดลอง

2) การเลี้ยงปลาทดลอง โดยการปล่อยปลากะพงขาวขนาดความยาวตัวเฉลี่ยเริ่มต้น 15.73±1.37 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 58.03±16.47 กรัม (ภาพที่7) ที่ผ่านการฝึกให้กินอาหารเม็ดได้เป็นอย่างดีแล้วจากฟาร์มปลาเอกชน ลงเลี้ยงในกระชังในความหนาแน่น 300ตัว/กระชัง (13 ตัว/ลูกบาศก์เมตร) ซึ่งเป็นความหนาแน่นที่ใช้ในการเลี้ยงปลากะพงทั่วไปของเกษตรกร แบ่งเป็นกระชังชุดทดลองและชุดควบคุมอย่างละ 3 กระชัง

ภาพที่ 7 ขนาดน้ำหนักและความยาวตัวเริ่มต้นของปลาทดลองตัวอย่าง

3) การให้อาหาร อาหารที่ใช้ในการทดลอง คืออาหารเม็ดสำเร็จภาพสำหรับปลาทะเล เปอร์เซ็นต์โปรตีนเฉลี่ย 40 เปอร์เซ็นต์ กำหนดการให้อาหารปลาทดลองแบบกินจนอิ่มวันละ 2 ครั้ง (08.00 น. และ 16.30 น.) การเสริมจุลินทรีย์ทำวันละ 1 ครั้งในมื้อเย็น โดยการพ่นแบบสเปรย์จุลินทรีย์โปรไบโอติกในระดับ 20 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ให้กระจายสม่ำเสมอบนอาหารและปิดฝาบ่มเป็นเวลา 30 นาทีก่อนนำไปให้ปลาทดลองกิน ใช้ระยะเวลาในการทดลอง 90 วัน บันทึกปริมาณอาหารที่ใช้จริงของแต่ละกระชัง

4) ในระหว่างเลี้ยงทำการสุ่มปลาแต่ละกระชังของทุกชุดการทดลองเพื่อตรวจสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่อยู่ในทางเดินอาหาร และสุ่มชั่งน้ำหนักและวัดความยาวของปลาทุกๆ 20 วันจนสิ้นสุดการทดลอง และนับจำนวนปลาที่รอดตายทั้งหมดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ตรวจวัดคุณภาพน้ำทุกๆ 2 สัปดาห์

5) ตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่มีชีวิต จากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกปลากะรังที่ใช้ศึกษาด้วยวิธี spread plate (Nancy *et at.,*1960) บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS ซึ่งเป็นอาหารที่จำเพาะกับจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตกรดแลคติก เพื่อตรวจหา *L. plantarum* เมื่อทำการแยกเชื้อเรียบร้อยแล้วทำการบ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อ (incubator) เป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงทำการนับ

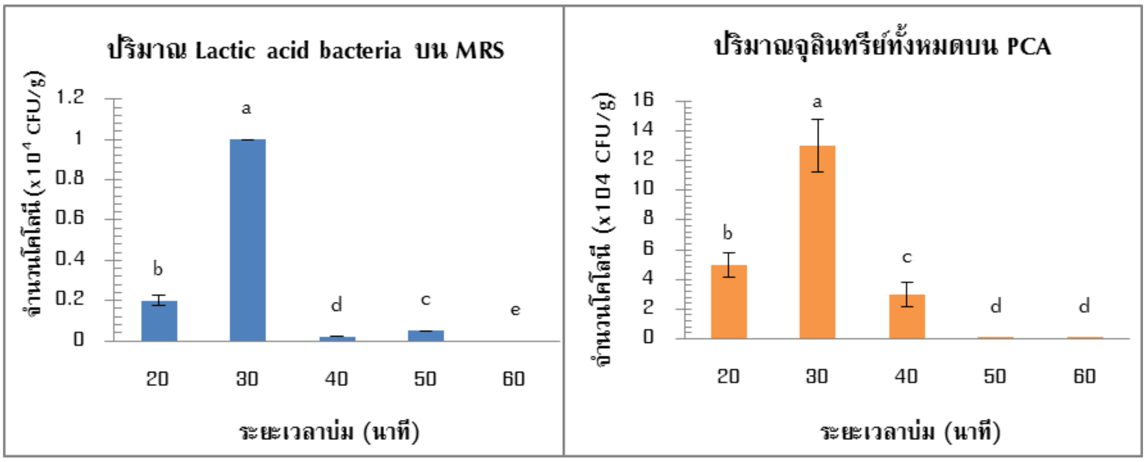
จำนวนเชื้อจุลินทรีย์บนอาหาเลี้ยงเชื้อบนอาหารทั้งสองชนิดในแต่ละความเข้มข้นแล้วหาค่าเฉลี่ย (CFU) ทำการตรวจจำนวนที่มีชีวิตทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 2 เดือน

6) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มด้วยวิธี Independent- samples t-test โดยข้อมูลที่นำมาเปรียบเทียบได้แก่ น้ำหนักตัวเฉลี่ย น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์รอดตาย อัตราแลกเนื้อ ปริมาณผลผลิต ต้นทุน ผลตอบแทน

บทที่ 4
ผลดำเนินการวิจัย

4.1ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการบ่มจุลินทรีย์โปรไบโอติกบนอาหารเม็ด

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการบ่มเชื้อโปรไบโอติกบนอาหารเม็ด โดยใช้ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกที่มีการผสมระหว่างจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติก *L. plantarum* IFS-1 (แยกได้จากปลากะรัง, *E. coioides*) และยีสต์ *Candida troplicalis* ซึ่งช่วยเสริมประสิทธิภาพของโปรไบโอติก โดยมีเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ 6.7 X 10^7 CFU/mL ภายหลังบ่มเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกบนอาหารเม็ดที่ระยะเวลาการบ่ม 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที และนำไปตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่มีชีวิตภายหลังการบ่มที่ระยะเวลาต่างๆ ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS สำหรับการตรวจสอบเชื้อกลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรีย และ PCA สำหรับการตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ผลพบว่า บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองสูตร ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเมื่อบ่มที่ระยะเวลาต่างกันดังกล่าวมีความแตกต่างกันทางสถิติ (*P<0.05*) (ภาพที่8)

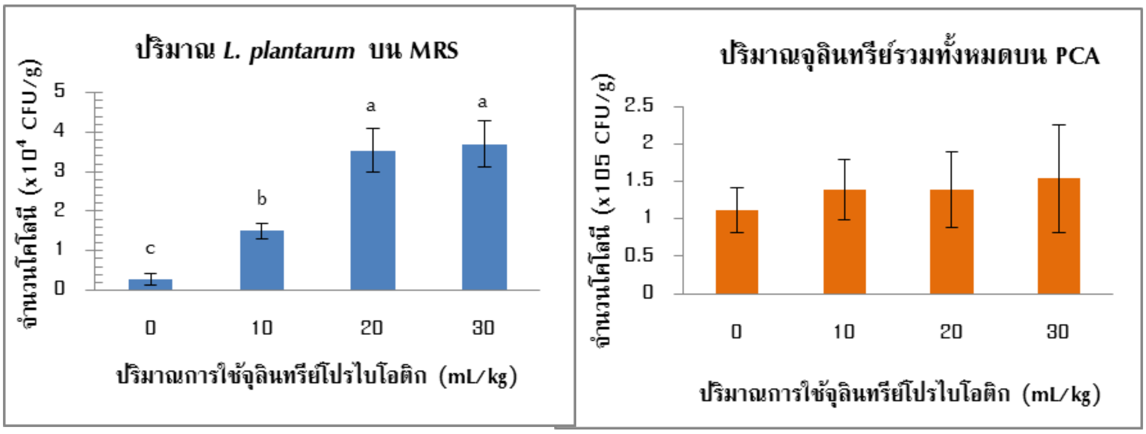


ภาพที่8 ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเมื่อบ่มบนอาหารสำเร็จรูปที่ใช้เลี้ยงปลากะพงขาวที่เวลา 20,30,40,50 และ 60 นาที (ระดับจุลินทรีย์33.33 มิลลิลิตร: อาหาร 1 กิโลกรัม)

จากภาพที่ 5 จะเห็นว่าระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการบ่มเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกบนอาหารก่อนนำไปเลี้ยงปลา คือ 30 นาทีเนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่ทำให้จุลินทรีย์ที่ทดสอบด้วยอาหารสูตร MRS และ PCA เพิ่มปริมาณสูงที่สุด และสูงกว่าระยะเวลาอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P<0.05*)

4.2 ระดับการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่เหมาะสมในอาหารที่ใช้เลี้ยงปลากะพงขาว

จากการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในระดับที่แตกต่างกัน คือ 0, 10, 20 และ 30 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ใช้เวลาบ่มเชื้อนาน 30 นาทีก่อนนำไปให้ปลาทดลองกิน และสุ่มตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกจากระบบทางเดินอาหารของปลาทดลองทุกสัปดาห์เป็นเวลา 8สัปดาห์ ผลพบว่า การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกลงในอาหารที่ระดับ0, 10, 20 และ 30 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลทำให้ปริมาณ *L. plantarum*ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อMRS แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P<0.05*) แต่ทำให้ปริมาณจุลินทรีย์รวมทั้งหมดปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (*P>0.05*)



ภาพที่ 9 ปริมาณจุลินทรีย์รวมและชนิด *L. plantarum* ที่แยกได้จากลำไส้ปลาทดลองเมื่อได้รับการเสริมผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกที่ระดับ 0, 10, 20 และ 30 mL/kg

จากภาพที่ 9 จะเห็นว่าการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ระดับ 20 และ 30 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัมส่งผลให้มีปริมาณ *L. plantarum* ในลำไส้ของปลาทดลองโดยเฉลี่ยสูงกว่าการใช้ที่ระดับ 0 และ 10 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P<0.05*) และเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ระดับ 20 และ 30มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัมทำให้ปลาทดลองมีน้ำหนักตัวเฉลี่ยสูงกว่าการใช้ที่ระดับ 0 และ 10 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P<0.05*) นอกจากนี้การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ระดับ 10-30 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัมยังทำให้น้ำหนักตัวที่เพิ่มต่อวันของปลาทดลองสูงกว่าที่ระดับการใช้ 0 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P<0.05*) ขณะที่การใช้ที่จุลินทรีย์โปรไบโอติกในทุกระดับของการทดลองทำให้ปลาทดลองมีขนาดความยาวตัว การรอดตาย และ อัตราแลกเนื้อไม่แตกต่างกันทางสถิติ (*P>0.05*) (ตารางที่1)

ตารางที่ 1 ผลการทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวโดยการเสริมผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรไบโอติกต่างกัน 4 ระดับ 0, 10, 20 และ 30 มิลลิลิตร/อาหาร 1 กิโลกรัม ในระยะเวลาการเลี้ยง 2 เดือน (Mean±S.E.)

	ปริมาณการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติก (มิลลิลิตร/อาหาร 1 กิโลกรัม)			
	0	10	20	30
จำนวนปลาเริ่มต้น (ตัว)	300	300	300	300
น้ำหนักตัวเริ่มต้น (ก.)	0.77±0.02	0.78±0.04	0.80±0.06	0.79±0.05
ความยาวตัวเริ่มต้น (ซม.)	3.98±0.02	4.03±0.02	4.00±0.02	4.01±0.02
จำนวนตัวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง	172.67±.36.86	202.67±9.67	203.00±20.95	221.67±2.10
รอดตาย (%)	57.57±12.28	67.56±3.22	67.67±6.98	73.89±8.03
น้ำหนักตัวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ก.)	24.75±0.87^{b}	26.02±1.05^{b}	29.34±1.10^{a}	26.48±1.14^{ab}
ความยาวตัวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ซม.)	12.03±0.15	12.28±0.16	12.75±0.20	12.33±0.19
น้ำหนักเพิ่มต่อวัน (ADG; ก./วัน)	0.40±0.02^{b}	0.44±0.01^{b}	0.48±0.01^{ab}	0.51±0.02^{a}
อัตราแลกเนื้อ	1.37±0.28	1.11±0.05	1.07±0.06	1.00±0.06

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละแถวแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การวิเคราะห์คุณภาพน้ำทุกระยะเวลา 8 สัปดาห์พบว่าคุณภาพน้ำมีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั่วไปเนื่องจากการทดลองทำในบ่อที่มีระบบกรองชีวภาพน้ำที่ใช้มีการหมุนเวียนตลอดเวลาและมีการถ่ายน้ำช่วยด้วย โดยค่าเฉลี่ยคุณภาพน้ำในแต่ละสัปดาห์แสดงในตารางผนวกที่ 1

4.3 ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์โปรไบโอติกเมื่อใช้เลี้ยงปลากะพงขาวในกระชัง

ผลการทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวจากขนาดเริ่มต้นประมาณ 11.6 เซนติเมตร (5 นิ้ว) เพื่อให้ได้ขนาดตลาดในกระชังขนาด 4 x 4 เมตร ที่แขวนลอยอยู่ในบ่อดิน เป็นเวลา 3 เดือนข้อมูลต่างๆ เกี่ยวกับการเจริญเติบโต การรอดตายและผลผลิต เปรียบเทียบกันระหว่างชุดทดลองซึ่งมีการเสริมผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกในอาหาร (20 mL/kg) ก่อนใช้เลี้ยงปลากะพงขาวกับชุดควบคุมซึ่งเป็นอาหารปกติไม่เสริมโปรไบโอติกได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าร้อยละของการรอดตายของปลากะพงขาวไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวเพิ่มต่อวัน (ADG) ของปลากะพงขาวในชุดทดลองสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และค่าอัตราแลกเนื้อของปลากะพงขาวในชุดทดลองต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ผลการสุ่มตัวอย่างปลาทุกกระชังมาตรวจหาปริมาณของจุลินทรีย์โปรไบโอติกหลัก *L. Plantarum* ในผลิตภัณฑ์ทุก20 วัน จำนวน 4 ครั้ง พบว่า ปริมาณของจุลินทรีย์โปรไบโอติกในทางเดินอาหารของปลาในกลุ่มทดลองมีมากกว่ากลุ่มควบคุมย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 3)

การวิเคราะห์คุณภาพน้ำตลอดระยะการทดลอง100 วันพบว่าคุณภาพน้ำมีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั่วไปแม้ว่าตลอดระยะการทดลองเลี้ยงจะไม่มีการถ่ายน้ำ อาจเนื่องจากมีปริมาณน้ำฝนเติมเข้าบ่อเลี้ยงอยู่บ่อยครั้ง กระชังที่เลี้ยงแขวนลอยอยู่ในบ่อขนาดใหญ่น้ำที่ใช้มีการหมุนเวียนตลอดเวลา โดยความเค็มมีค่าระหว่าง 5-10ส่วนในพันส่วน ความเป็นด่างมีค่าระหว่าง 80-120 มิลลิกรัมต่อลิตร แอมโมเนียมีค่าระหว่าง 0-1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนไตรท์มีค่าระหว่าง 0-1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำมีค่าระหว่าง 5-8 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเป็นกรด-ด่างของน้ำมีค่าอยู่ระหว่าง 7-8.3

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรไบโอติก ในการเลี้ยงปลากะพงขาวในกระชัง เป็นเวลา 3 เดือน (Mean±S.E.)

สิ่งทดลอง	**กลุ่มทดลอง**	**กลุ่มควบคุม**	***p-value***
จำนวนปลาเริ่มต้น (ตัว)	286	286	
น้ำหนักตัวเริ่มต้น (ก.)	20.1±0.2	20.7±0.3	0.065
ความยาวตัวเริ่มต้น (ซม.)	11.7±0.4	11.7±0.3	0.919
จำนวนตัวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง	257±15	253±8	0.838
เปอร์เซ็นต์รอดตาย (%)	89.9±5.2	88.6±2.8	0.838
น้ำหนักตัวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ก.)	488.18±0.1	472.7±0.0	0.010*
ความยาวตัวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ซม.)	32.8±0.1	32.5±0.1	0.026*
น้ำหนักเพิ่มต่อวัน (ADG; ก./วัน)	5.1±0.2	4.5±0.0	0.049*
ปริมาณอาหารที่ใช้ไป (กก.)	172.3±4.9	177.3±0.7	0.362
อัตราแลกเนื้อ	1.4±0.03	1.5±0.03	0.022*
ต้นทุน/กก.	95.3±1.8	98.3±1.8	0.304

หมายเหตุ: *แถวในแนวนอนมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P<0.05*)

ตารางที่ 3 ปริมาณจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่คัดแยกได้จากลำไส้ปลากะพงขาวในสภาวะการเลี้ยงในกระชังบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS

ครั้งที่	ปริมาณจุลินทรีย์โปรไบโอติก (CFU/g)	
	ชุดควบคุม	ชุดทดลอง
1	$8.20 \pm 0.21 \times 10^{2b}$	$4.79 \pm 0.48 \times 10^{5a}$
2	$6.50 \pm 0.50 \times 10^{2b}$	$1.61 \pm 0.25 \times 10^{6a}$
3	$4.67 \pm 0.36 \times 10^{3b}$	$1.57 \pm 0.23 \times 10^{5a}$
4	$1.02 \pm 1.45 \times 10^{5c}$	$4.97 \pm 1.01 \times 10^{4c}$

* ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละครั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P<0.05*) จากจำนวนเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่คัดแยกจากลำไส้ปลากะพงขาว

จากตารางที่ 2 เมื่อนำอัตราการเจริญเติบโตมาทำการคำนวณจนถึงขนาดตลาด จากผลการศึกษาพบว่า ปลากะพงขาวที่เลี้ยงโดยใช้โปรไบโอติกผสมในอาหารสามารถโตจนได้ขนาดที่ตลาดต้องการ ใช้เวลาประมาณ 120 วัน และเมื่อคิดที่ขนาดเฉลี่ยใกล้เคียงกัน (น้ำหนักตัว 600 กรัม) ปลาที่เลี้ยงโดยไม่ใช้โปรไบโอติกอาจต้องใช้เวลาประมาณ 136 วัน ดังนั้นการเลี้ยงปลากะพงขาวโดยใช้โปรไบโอติกช่วยลดเวลาการเลี้ยงสั้นลงคิดเป็นร้อยละ 13 ส่วนรายละเอียดต้นทุนการผลิตจนได้ขนาดตลาดได้มีการนำค่าทางหลักเศรษฐศาสตร์ ได้แก่ ค่าเสียโอกาสการลงทุน ค่าแรงงาน ค่าเสื่อมราคา มาคำนวณด้วย เพื่อให้ผลที่ได้สะท้อนถึงต้นทุนที่เป็นจริง โดยมีรายละเอียดดังตารางที่ 3 โดยที่ต้นทุนคงที่ของวัสดุและอุปกรณ์ คิดจากอายุการใช้งาน (กระชัง โครงกระชัง และปั๊มลม มีอายุการใช้งาน 3 ปี 5 ปี และ 5 ปี ตามลำดับ) และจำนวนครั้งที่สามารถเลี้ยงจนได้ขนาดตลาด (500-800 กรัม/ตัว) พบว่า การเลี้ยงปลากะพงขาวใน 1 กระชังที่แขวนลอยอยู่ในบ่อและมีการเสริมโปรไบโอติกลงในอาหารที่ใช้เลี้ยง 1 รอบมีต้นทุนทั้งหมดเฉลี่ยต่อกิโลกรัมเท่ากับ 118.94 บาท มีกำไรสุทธิต่อกระชัง 167.05 บาท ในรอบ 1 ปี สามารถทำได้ 3 ครั้ง ดังนั้นใน 1 ปี จะได้กำไรเฉลี่ยต่อกระชังเท่ากับ 501 บาท ส่วนการเลี้ยงในรูปแบบเดียวกันแต่ไม่เสริมโปรไบโอติกกลงในอาหารที่ใช้เลี้ยง 1 รอบมีต้นทุนทั้งหมดเฉลี่ยต่อกิโลกรัมเท่ากับ 124.89 บาท มีกำไรสุทธิต่อกระชัง-759.41บาท ในรอบ 1 ปี สามารถทำได้ 2 ครั้ง ดังนั้นใน 1 ปี จะได้กำไรเฉลี่ยต่อกระชังเท่ากับ –1,518.82 บาท รายละเอียดเกี่ยวกับต้นทุนและผลตอบแทนการเลี้ยงปลากะพงขาวตามรูปแบบการทดลองนี้ โดยยึดหลักการทางเศรษฐศาสตร์แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ต้นทุนและผลตอบแทนจากการเลี้ยงปลากะพงขาวในกระชังที่แขวนลอยในบ่อตั้งแต่ขนาด 4 นิ้ว จนได้ขนาดตลาด (น้ำหนักตัวประมาณ 600 กรัม)

รายการ	ชุดควบคุม			ชุดทดลอง		
	ต้นทุนที่เป็นเงินสด	ต้นทุนไม่เป็นเงินสด	ต้นทุนรวม	ต้นทุนที่เป็นเงินสด	ต้นทุนไม่เป็นเงินสด	ต้นทุนรวม
1. ต้นทุนคงที่ (บาท)		**849.00**	**849.00**		**565.93**	**565.93**
1.1 ค่าเสื่อมราคากระชัง		840.50	840.50		560.33	560.33
1.2 ค่าเสียโอกาสเงินลงทุนคงที่*		8.50	8.50		5.60	5.60
2. ต้นทุนผันแปร (บาท)	**14,228.33**	**4,262.08**	**18,490.41**	**14,262.00**	**3,778.62**	**18,040.62**
2.1 ค่าพันธุ์ปลา	2,860.00		2,860.00	2,860.00		2,860.00
2.2 ค่าอาหารปลา	9,290.00		9,290.00	8,808.00		8,808.00
2.3 ค่าโปรไบโอติก	-			990.00		990.00
2.4 ค่าไฟฟ้า	1,778.33		1,778.33	1,404.00		1,404.00
2.5 ค่าแรง	300.00	4,080.00	4,380.00	300.00	3,600	3,900
2.6 ค่าเสียโอกาสเงินลงทุนผันแปร		182.08	182.08		178.62	178.62
3. ต้นทุนรวมทั้งหมด (บาท)	**14,128.33**	**5,111.08**	**19,339.41**	**14,262.00**	**4,344.55**	**18,706.55**
4. ผลผลิตเฉลี่ยต่อกระชัง (กก.)**	154.84			157.28		
5. ราคาที่ขายได้ (บาท/กิโลกรัม)	120.00			120.00		
6.รายได้ทั้งหมดต่อกระชัง (บาท)	18,580			18,873.6		
7. รายได้สุทธิต่อกระชัง (บาท)	89.59			832.98		
8. รายได้สุทธิเหนือเงินสดต่อกระชัง (บาท)	4,451.67			4,611.60		
9. กำไรสุทธิต่อกระชัง (บาท)	-759.41			167.05		
10. ต้นทุนทั้งหมดเฉลี่ยต่อกิโลกรัม (บาท)	124.89			118.94		
11. กำไรสุทธิเฉลี่ยต่อกิโลกรัม (บาท)	-4.90			1.06		

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการบ่มจุลินทรีย์โปรไบโอติกบนอาหารเม็ด

ปริมาณเชื้อที่ตรวจพบหลังจากให้มีการบ่มเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกบนอาหารเม็ด สามารถบอกถึงระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการปรับตัวและยึดเกาะบนอาหารเม็ดของจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่แยกได้จากลำไส้ปลากะรัง ซึ่งผลที่ได้สามารถใช้เป็นเทคนิคในการผสมผลิตภัณฑ์โปรไบโอกติกกับอาหารเม็ดให้ปลากินเพื่อทำให้ปลามีโอกาสได้รับโปรไบโอติกเพิ่มเข้าไปในร่างกายมากที่สุด จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการบ่มเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติบนอาหารเม็ดเลี้ยงปลากะพงขาวได้แก่ 30 นาที เนื่องจากตรวจพบปริมาณของเชื้อโปรไบโอติกมากที่สุดทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS และ PCA การที่ 30 นาทีเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดของการบ่มเชื้อเมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาอื่นๆ อธิบายได้ว่าระยะการเจริญของเชื้อ *L. plantarum* สามารถแบ่งเป็นระยะได้ดังนี้ ระยะที่ 1 lag phase ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์ปรับตัวกับสภาพแวดล้อมใหม่ใช้เวลา 2 ชั่วโมง จะมีการเพิ่มปริมาณเชื้อเล็กน้อย 7.07 log cfu/mLเป็น 7.11 log cfu/mLระยะที่ 2log phase เป็นระยะที่แบ่งเซลล์แบบทวีคูณ ใช้เวลา 12-16 ชั่วโมง ระยะที่ 3stationary phase เป็นระยะที่การแบ่งเซลล์คงที่โดยที่จำนวนเซลล์และปริมาณอาหารสมดุลกัน ใช้เวลา 16 ชั่วโมงขึ้นไป (รัชฎาพร, 2550) ดังนั้นในการทดลองหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มโปรไบโอติกกับอาหารเม็ดที่ 30 นาทีมีความเหมาะสมมากที่สุดเพราะอยู่ในช่วงเวลาของระยะ lag phase เซลล์กำลังปรับตัวและเพิ่มจำนวนอย่างช้าๆ เซลล์มีความแข็งแรงมากกว่าระยะ log phase พร้อมนี้ยังเป็นช่วงเวลาที่ปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่เมื่อปลาบริโภคเข้าไปก็ทำให้เซลล์พร้อมแบ่งตัวต่อได้ และในช่วง 30 นาทีนี้ ความชื้นภายในเซลล์ยังเพียงพอที่จะรักษากระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ให้ปกติ พร้อมทั้งรักษาอุณหภูมิให้เหมาะสมต่อการเจริญของ *L. plantarum* ซึ่งเป็นช่วง lag phase เป็นช่วงที่ปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่พร้อมที่จะแบ่งเซลล์แบบทวีคูณ และเพื่อให้จุลินทรีย์ยึดเกาะบนอาหารได้ดี โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *L. plantarum* คือ เจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 15-45 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ที่ 3.2 หรือ มากกว่า

5.2 สัดส่วนการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่เหมาะสมในอาหารที่ใช้เลี้ยงปลากะพงขาว

เมื่อทำการตรวจสอบปริมาณจุลินทรียโปรไบโอติกที่พบในผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ พบว่ามีปริมาณเริ่มต้นอยู่ที่ 10^7 CFU/g ซึ่งเป็นระดับปริมาณที่ยอมรับได้ว่าเป็น

ประโยชน์ต่อผู้ให้อาศัย ทั้งนี้ใน International Diary Federation (IDF) กำหนดให้ผลิตภัณฑ์เสริมโปรไบโอติกมีจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอย่างน้อย 10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร จนกระทั่งวันบริโภค (สิรสา, 2556 อ้างโดย Ouwehand and Salminen, 1998) และในหลายประเทศได้กำหนดให้จำนวนจุลินทรีย์โปรไบโอติกขั้นต่ำอยู่ที่ 10^6CFU ต่อมิลลิลิตร เช่นประเทศอาเจนติน่า บราซิล อุรุกวัย และปารากวัย (สิรสา, 2556 อ้างโดย Kresaekoopt *et at.*, 2003) ดังนั้นจึงนับได้ว่า ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้มีคุณภาพในระดับมาตรฐาน และเมื่อนำไปทดสอบเพื่อหาปริมาณการใช้ที่เหมาะสม พบว่า สัดส่วนของผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรไบโอติกในสัดส่วน20 และ 30 มล.: อาหาร 1 กก. มีปริมาณ *L. plantarum* ปรากฏอยู่ในลำไส้ของปลาทดลองเฉลี่ยทั้ง 7 สัปดาห์ ประมาณ3.54×10^4 และ 3.70×10^4 CFU/g ตามลำดับ ทั้งนี้เป็นค่าปริมาณที่สูงกว่าที่พบในปลาทดลองที่เสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกในอัตรา 0 และ 10 มล. : อาหาร 1 กก. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) *L. plantarum* เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถทนต่อความเป็นกรด ได้ดี ดังเช่นกลุ่ม *L. plantarum* ที่อยู่ในอาหารหมักมักมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 4 และนอกจากนี้ *L. plantarum* ยังสามารถเข้าไปเจริญต่อในกระเพาะของมนุษย์อีกด้วย (Johansson *et at.*, 1993) Walford and Lam (1993) รายงานว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างของกระเพาะอาหารของปลากะพงขาวมีค่าประมาณ 3.7 ซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่างดังกล่าว *L. plantarum* สามารถมีชีวิตอยู่ได้ เพราะ *L. plantarum* สามารถทนต่อความเป็นกรดสูงในกระเพาะอาหาร และทนต่อน้ำดีในลำไส้เล็กส่วนต้นและเพิ่มจำนวนได้ชั่วคราวในระบบทางเดินอาหารโดยยึดเกาะบริเวณลำไส้เล็กและเยื่อบุลำไส้ใหญ่ (Bixquert, 2009) ดังนั้นเมื่อพิจารณาผลจากปริมาณ *L. plantarum* ที่ตรวจพบได้จากลำไส้ของปลาทดลองผลการทดลองครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกเสริมลงในอาหารปลากะพงขาวในสัดส่วน 20 -30 มล.:อาหาร 1 กก.จึงมีความเหมาะสมมากกว่าการใช้ในสัดส่วน 0 -10 มล. : อาหาร 1 กก. ขณะเดียวกันผลจากการทดลองเบื้องต้นพบว่า การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกเสริมลงในอาหารปลากะพงขาวในสัดส่วนที่มากกว่า 30 มล.:อาหาร 1 กก. ไม่เป็นประโยชน์เนื่องจากตรวจพบปริมาณ *L. plantarum* ในทางเดินอาหารของปลาลดลง แต่เมื่อพิจารณาจากการเจริญเติบโตพบว่า การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกเสริมลงในอาหารปลากะพงขาวในสัดส่วน 10, 20 และ 30 มล. : อาหาร 1 กก. ทำให้ปลามีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นร้อยละ 5, 19 และ 7 ของปลาในชุดทดลองที่ไม่เสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกลงในอาหาร (ชุดควบคุม) ตามลำดับ ดังนั้นจึงเห็นว่า การเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกลงในอาหารด้วยสัดส่วน 20 มล. : อาหาร 1 กก. ให้การเจริญเติบโตดีที่สุด โดยที่ไม่สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตได้อีกหากเพิ่มปริมาณโปรไบโอติก ทั้งนี้เนื่องจากผลการศึกษาวิจัยโปรไบโอติกในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างโปรไบโอติกและพื้นผิวเซลล์ของโฮสต์ปริมาณจุลินทรีย์มีความสัมพันธ์กับความต้องการใช้พลังงานในโฮสต์เนื่องจากหากจำนวนจุลินทรีย์หรือจุลินทรีย์โปรไบโอติกในลำไส้ยิ่งมากโฮสต์จะได้รับพลังงานจากสารอาหารน้อยลงตามจำนวนจุลินทรีย์ในลำไส้ซึ่งเป็นผลมาจากความต้องการของจุลินทรีย์ที่ต้องการ

พลังงานในกระบวนการย่อยและดูดซึมสารอาหารที่โฮสต์ได้รับ ดังนั้นหากมีจุลินทร์อยู่ในลำไส้ของโฮสต์และเพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างต่อเนื่องประสิทธิภาพในการดูดซึมอาหารของโฮสต์จะลดลงซึ่งส่งผลโดยตรงต่ออัตราแลกเนื้อที่จะได้รับจะมีอัตราต่ำลงตามประสิทธิภาพการดูดซึมอาหารของโฮสต์ (Cho, 2011; Kenny *et al*., 2011)

5.3 ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์โปรไบโอติกเมื่อใช้เลี้ยงปลากะพงขาวในกระชัง

หลังจากพบอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเสริมผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกจากปลากะรังบนอาหารเม็ดสำหรับเลี้ยงปลากะพงขาวจึงได้นำค่าอัตราส่วนที่เหมาะสมดังกล่าวไปทดสอบการเลี้ยงในสภาวะนอกห้องทดลอง และโดยเปรียบเทียบผลที่ได้ระหว่างกลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับโปรไบโอติก) และกลุ่มทดลอง (ได้รับโปรไบโอติก) ผลพบว่า ปลาในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม มีร้อยละของการรอดตายไม่แตกต่างกัน (*P>0.05*) เป็นเพราะปลาทั้งหมดที่นำมาทดลองมีขนาดใหญ่และแข็งแรง และได้รับการฝึกให้รับอาหารเม็ดได้เป็นอย่างดีก่อนการทดลองแล้ว อีกทั้งคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงมีคุณภาพดีตลอดการทดลอง น้ำมีการไหลเวียนดีทั่วบ่อ สภาพแวดล้อมในบ่อจึงมีคุณภาพดีสม่ำเสมอตลอดการทดลอง และไม่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคได้ แต่ปลากะพงขาวในกลุ่มทดลองมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัว ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวเพิ่มต่อวัน (ADG) สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีค่าอัตราแลกเนื้อต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P<0.05*) ทั้งนี้เมื่อตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ *L. plantarum* ในทางเดินอาหารของปลาตัวอย่างจากทั้งสองกลุ่ม พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ *L. plantarum* ในทางเดินอาหารของปลากลุ่มทดลองสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P<0.05*) ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นต่อวันของกลุ่มทดลองที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม และอัตราการแลกเนื้อที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม เกิดจากในผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกจากปลากะรังมีส่วนผสมระหว่าง *L.plantarum* และยีสต์ ซึ่ง *L.plantarum* มีประสิทธิภาพ และคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกสามารถพบได้ในระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิต แต่ไม่ได้อยู่ในปริมาณที่เป็นประโยชน์ผู้ให้อาศัย ดังนั้นเมื่อเสริมด้วยจุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหารจึงทำให้มีจำนวนจุลินทรีย์ที่เป็นโยชน์เพิ่มขึ้น ซึ่ง *L. plantarum* สามารถที่จะอาศัยอยู่และเพิ่มจำนวนได้ในชั่วคราวในระบบทางเดินอาหาร *L. plantarum* มีผลทำให้ในการช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันควบคุมกลุ่มจุลินทรีย์ที่ให้โทษ ทำให้อัตราการรอดของผู้ให้อาศัยสูง ดังเช่นในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม ได้มีการใช้ *L. plantarum* LP64 ซึ่งเป็นสายพันธุ์สำหรับกุ้งก้ามกรามมีผลทำให้อัตรารอดของกุ้งที่ได้รับโปรไบโอติก สูงขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ชมพูนุท ,2554) *L. plantarum* ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน สามารถช่วยย่อยไขมัน โปรตีน ทำให้เป็นโมเลกุลที่เล็กลง ทำให้ดูดซึมได้ง่ายขึ้น สร้างกรดแลคติกเพื่อปรับสภาพระบบทางเดินอาหารไม่ให้จุลินทรีย์ชนิดก่อโรคเจริญดังนั้นตามคุณสมบัติความเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกของ *L. Plantarum* นี้จึงส่งผลให้ปลา

กะพงขาวในกลุ่มทดลองสามารถย่อยอาหารเม็ดได้ดี พร้อมดูดซึมสารอาหารได้มาก และมีระบบภูมิคุ้มกันที่ดีมีความแข็งแรง จึงทำให้มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นต่อวันสูง และอัตราการแลกเนื้อที่ต่ำ นอกจากนี้ ในผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกจากปลากะรังยังมียีสต์เป็นส่วนผสมซึ่งเป็นทำหน้าเป็นอาหารเสริมโปรตีนและกรดอะมิโน ให้แก่ปลากะพงขาวกลุ่มทดลองเพื่อให้การเจริญเติบโตดียิ่งขึ้น และยังเป็นแหล่งอาหารให้แก่ *L. Plantarum* ในผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกอีกด้วย และจากการทดลองพบว่าในกลุ่มทดลองนั้นมีอัตราการกินอาหารต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งในการทดลองครั้งนี้จะให้อาหารปลาตามความต้องการของปลาโดยให้จะหยุดให้เมื่อปลาหยุดกินอาหารซึ่งพบว่าในกลุ่มควบคุมปลาจะกินอาหารไปเรื่อยๆ และอิ่มช้ากว่ากลุ่มทดลอง นั้นเกิดจากกลุ่มทดลองมีประสิทธิภาพในการย่อยและการดูดซึมอาหารมีประสิทธิภาพดีกว่า ซึ่งกลุ่มทดลองมีจุลินทรีย์ *L. plantarum* ที่ช่วยปรับสมดุลย์ในระบบทางเดินอาหาร และช่วยเสริมประสิทธิภาพในการย่อยและการดูดซึมอาหารของปลากะพง ส่งผลให้กระบวนการเมแทบอลิซึมเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพได้รับอาหารอย่างเพียงพอเพราะ *L. plantarum* ช่วยส่งเสริมการดูดซึมทั้งโปรตีนและไขมันโดยย่อยให้มีโมเลกุลขนาดเล็กดูดซึมได้งานจึงไม่จำเป็นต้องกินอาหารในปริมาณมากเหมือนกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับจุลินทรีย์โปรไบโอติก ซึ่งประสิทธิภาพในการย่อยและการดูดซึมอาหารทั้งไขมันและโปรตีนน้อยกว่าทำให้ได้รับสารอาหารไม่เพียงพอจึงต้องการอาหารมากกกว่ากลุ่มทดลองนอกจากนี้สามารถอธิบายถึงเหตุผลที่จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่แยกได้จากลำไส้ปลากะรังเมื่อนำมาใช้ในการเลี้ยงปลากะพงขาวแล้วให้ผลดีดังนี้ เนื่องจาก *L. plantarum* เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถพบได้ในระบบทางเดินอาหารปลากะพงขาวเช่นกัน ดังที่พบในระบบทางเดินอาหารของปลากะพงขาวกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เสริมโปรไบโอติกแต่สามารถพบ *L. plantarum* ได้ซึ่งมีอยู่ในปริมาณน้อยไม่เกิดประโยชน์ต่อปลานอกจากนี้ปลากะรังและปลากะพงขาวสามารถอาศัยอยู่ในน้ำกร่อยได้เช่นเดียวกัน ระบบทางเดินอาหารของปลากะรังและปลากะพงขาวซึ่งเป็นปลากินเนื้อเช่นกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกพบว่าปริมาณ *L. plantarum* ไม่แตกต่างกันโดยมีแนวโน้มลดลงเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งอาจจะเกิดจากจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่มีชีวิตในผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกมีจำนวนลดลงเมื่อระยะเวลาผ่านไปหลังจากเปิดใช้ผลิตภัณฑ์ ในการศึกษาได้เก็บผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อนำมาตรวจสอบการมีชีวิตของจุลินทรีย์โปรไบโอติกเมื่อระยะเวลาผ่านไป เป็นเวลา 8 สัปดาห์พบว่า พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ *L. plantarum* มีปริมาณลดลง ซึ่งจุลินทรีย์ *L. plantarum* เริ่มต้น log 7.90 CFU/g และเมื่อครบ 8 สัปดาห์ *L. plantarum* ที่ยังมีชีวิตอยู่เหลือ log 5.87 CFU/g โดยเฉลี่ยแล้วจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่เก็บที่อุณหภูมิห้องลดลงเดือนละ 10 เท่า ซึ่งส่งผลให้ปริมาณจุลินทรีย์โปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ลดลงจากมาตรฐานกำหนด ซึ่งกำหนดไว้ที่ไม่น้อยกว่า 10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อนำไปใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำทำให้ประสิทธิภาพลดลง จำนวนจุลินทรีย์ลดลง 10 เท่า ซึ่งส่งผลให้ประสิทธิภาพลดลง เนื่องจากการเลี้ยงปลากะพงขาวเพื่อจำหน่ายต้องใช้ระยะเวลาในการเลี้ยง 4 เดือนขึ้นไป ซึ่งในการใช้ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกสามารถนำ

มาเก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำหรือตู้เย็นซึ่งจะช่วยรักษาการมีชีวิตของจุลินทรีย์โปรไบโอติกได้ เพราะพบว่าเชื้อสด *L. plantarum* ที่ใช้เลี้ยงกุ้งก้ามกรามสามารถเก็บรักษาได้นาน 30 วันเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ชมพูนุช, 2554) แต่อุณหภูมิต่ำก็สามารถรักษาความมีชีวิตของจุลินทรีย์โปรไบโอติกได้ช่วงระยะเวลาที่ยังไม่เพียงพอต่อการระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำจนกระทั่งจำหน่าย จึงจำเป็นที่จะพัฒนาผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกจากปลากะรังเพื่อให้คงประสิทธิภาพ มีจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด สะดวกต่อการใช้งานและการเก็บรักษา ซึ่งการพัฒนาผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกก็มีหลายวิธี ได้แก่ การห่อหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนตซึ่งจะช่วยให้จุลินทรีย์ทนต่อกรด สูงได้มากกว่าเซลล์อิสระ และมีอัตราการรอดชีวิตมากขึ้น (สิรสา, 2555) ซึ่งการพัฒนาผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกดังกล่าวจะช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีประสิทธิภาพมากขึ้นและสะดวกต่อการใช้งาน ส่งเสริมการเลี้ยงสัตว์น้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ

บทที่ 6
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการวิจัย

1) การบ่มจุลินทรีย์โปรไบโอติกบนอาหารเม็ดนาน 30 นาที ก่อนนำไปเลี้ยงปลา มีความเหมาะสมที่สุด เนื่องจากทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ที่ทดสอบด้วยอาหารสูตร MRS และ PCA เพิ่มขึ้นสูงที่สุด และสูงกว่าระยะเวลาอื่นๆ (20, 40, 50 และ 60 นาที) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

2) การเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ระดับ 20 - 30 มิลลิลิตรในอาหาร 1 กิโลกรัม มีแนวโน้มทำให้ผลผลิตปลากะพงขาวด้านน้ำหนักตัวและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงกว่าการเสริมในระดับ 0- 10 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

3) จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่พัฒนาจากปลากะรังมีประสิทธิภาพเมื่อมีการประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงปลากะพงขาว โดยการใช้ที่ปริมาณ 20 มิลลิลิตรในอาหาร 1 กิโลกรัม ช่วยให้การเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นร้อยละ 19

6.2 ข้อเสนอแนะ

1) ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรไบโอติกช่วยเพิ่มผลผลิตจากการเลี้ยงปลากะพงขาวได้

2) การใช้ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรไบโอติกเพื่อเพิ่มผลผลิตจากการเลี้ยงปลาควรระมัดระวังเรื่องการเก็บรักษาคุณภาพของจุลินทรีย์โปรไบโอติก โดยภายหลังที่เปิดใช้ไม่หมดการเก็บรักษาเพื่อให้คงคุณภาพสำหรับการใช้ครั้งต่อไปต้องระมัดระวังเรื่องการปนเปื้อนของแบคทีเรียอื่นๆ

3) ควรมีการศึกษาต่อไปเพื่อพัฒนารูปแบบของผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรไบโอติกให้มีความสะดวกใช้มากขึ้น โดยรูปแบบที่พัฒนาขึ้นควรทำให้ประสิทธิภาพการใช้เพิ่มขึ้นด้วย

บรรณานุกรม

เจษฎาธีรศรัณยานนท์. 2557. การศึกษากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสอะไมเลสเซลลูเลสและไลเปสในระบบทางเดินอาหารของปลากะพงขาว (*Latescalcarifer*). การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 52. หน้า 318-325.

ชมพูนุท แก้วใจรัก. 2554. การใช้จุลินทรีย์*Lactobacillus plantarum*LP64 เป็นโปรไบโอติกในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันกุ้งก้ามกราม (*Marcrobarchiumrosenbergii*) .วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไชยวัฒน์ ไชยสุต และศศิธร ศิริลุน. 2553. โปรไบโอติก: จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ. วารสารสำนักการแพทย์ทางเลือก. 3(3): หน้า 4-16.

ปวเรศวร์ อินทุเศรษญ์ ศศิวิมล ปิติพรชัย พรรณทิพย์ สุวรรณสาครกุล บดินทร์ อิทธิพงษ์ และ สิริรัตน์ จงฤทธิพร.2549. การใช้แบคทีเรียแลคติกเป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. การประชุมวิชาการประมง ประจำปี 2549. หน้า 365-377.

ปิ่นมณีขวัญเมือง. 2546. การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างแหนมของประเทศไทยเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ.วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พิกุล จิรวาณิชไพศาล. 2543. การใช้โปรไบโอติก.วารสารข่าวโรคสัตว์น้ำ ปีที่ 10 ฉบับที่ 1

ภวัตสังขะวัฒนะ. 2544. การพัฒนาผลิตภัณฑ์นมหมักคล้ายโยเกิร์ตโดยใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติก. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ยุทธพล คงกระจ่าง และนงนุช เลาหะวิสุทธิ์.2554. การใช้แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus spp.*เป็นโปรไบโอติกที่มีต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และปริมาณเชื้อวิบริโอในกุ้งขาวแวนนาไม. การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 49 สาขาประมง. หน้า 400-407.

รัชฎาพร อุดปวน.2550. การปรับปรุงคุณภาของกิมจิโดยการใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นและการพาสเจอไรส์. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 149 หน้า.

รัตนสุดา ไชยเชษฐ์.2554. การใช้อีเอ็มเป็นโปรไบติกในอาหารปลาโมง. วารสารวิจัย มข.16(2): หน้า 136-144.

สิรสา สุมงคล.2556. การเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกโดยวิธีการห่อหุ้มร่วมกับเส้นใยจากหัวพืช. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 90 หน้า

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2552. การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน บทบาทของจุลินทรีย์ และการประยุกต์ใช้. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 308 หน้า

องอาจ เลาหวินิจ. 2545. การใช้โปรไบโอติกในสัตว์น้ำ. นิตยสารสัตว์น้ำ. http://www.shrimpcenter.com/tshrimp021.htmL(วันที่สืบค้นข้อมูล: วันที่ 6 ตุลาคม พ.ศ 2557)

Aly, S.M., Mohamed, M.F. and John, G. 2008.Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in *Tilapia nilotica*(*Oreochromisniloticus*).Aquaculture Research. 39: 647-656.

Balamurugan, S. 2013. Probiotic in aquaculture.Drug Invention Today. 5: 55-59.

Balcazar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D, Vendrell, D., and Muzquiz, J.L.2006.The role of probiotics in aquaculture.Veterinary Microbiology. 114: 173-186

Bielecka, M. 2007. Probiotics in food.In Chemical and functional properties of food components.3rd .ed. 413-426.

Cho, J.H., Zhao, P.Y. and Kim, I.H. 2011. Probiotics as a Dietary Additive for Pigs: A Review. Journal of Animal and Veterinary Advances 16, 2127-2134.

Bixquert, J. M. 2009. Treatment of irritable bowel syndrome with probiotics anetiopathogenic approach at last. Rev EspEnfern Dig, 101(8): 553-564.

Devaraja, T.N., Yusoff, F.M. and Shariff, M . 2002. Changes in bacterial populations and shrimp production in ponds treated with commercial microbial products. Aquaculture. 206:245-256

EL-Haroun, E.R., Goda, A.M.A-S.andKabirChowdhury, M.A. 2006. Effect of dietary probiotic Biogens supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia (*Oreochromisniloticus*).Aquaculture Research. 37: 1473-1480.

Eric, G., Bertrand L. and Maurice R. 1991. Influence of pH initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*. Applied Microbiology and Biotechnology. 36: 96-99.

FAO/WHO. 2001. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food includingpowder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina.

Fuller, R., 1998.Probiotics in man and animals J. Applied Bacteriol. 66:365-378

Gatesoupe F.J., 1999. The use of probiotics in aquaculture.Aquacul. 180:147-165

Gullian , M., Thompson, F., and Rodriguez, J. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeusvannamei*.Aquaculture. 233: 1-14

Havenaar, R., Josh.J.H. andVeld.1992. Probiotics: A General View. Pp.155-170 In B.L.B.Wood (ed.)The Lactic Acid Bacteria in Health & Disease. Glasgow, U.K.

Irianto, A. and Austin, B. 2002.Use of the probiotic to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchusmykiss* (Walbuam). J. Fish Dis. 25:333-342

lactobacillus_plantarum.pdf (วันที่สืบค้นข้อมูล: วันที่ 14 กันยายน พ.ศ 2557)

Kenny, M., Smidt, H., Mengheri, E., Miller, B., 2011. Probiotics - do they have a role in the pig industry? Animal : an international journal of animal bioscience 5, 462-470.

Laurent, V., Geert R., Patrick S. and Willy V. 2000.Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture.Microbiology and Molecular Biology Reviews. 64 (4): 655-671.

Lilly, D.M., Stillwell, R.H., 1965. Probiotics: growth promoting factors produces by microorganisms. Science 147:747-748

Maaike, C. de V., Elaine, E. V., Michiel, K. and Willem, M. de V. 2006. Lactobacillus-survival, functional and potential probiotic prpperties in the human intestinal tract. International Diary Journal 16.1018-1028.

Mai, D. I. 2013. Evolution of probiotics on aquatic world: Potential effect, the current status in Egypt and recent prospective. Journal of Advance Research.http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2013.12.004. (วันที่สืบค้นข้อมูล: วันที่ 6 ตุลาคม พ.ศ 2557)

Nagendra, P. S., Warnakulasyriya, E.V. L., Margaret, L. B. and William, S. A. K. 1995.Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacteriumbifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage.International Dairy Journal. 5(5): 515-521.

Nayak, S. K. 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective. Fish & Shellfish Immunology. 29: 2-14.

O' Sullivan., and Daniel J. 2006. Primary sources of probiotic cultures. In Probiotic and health claims. 1-16.

Parker, R.B. 1974.Probiotics; the other half of the antimicrobial story. Anim. Nutr. Health.29:4-8

Priyadarshini, P., Deivasigamani, B., Rajasekar, T., Edward, G. J. G., Kumaran, S., Sakthivel, M.,Rinkinen, M., Jalava, K., Westermarck, E., Salminen, S. and Ouwehand, A.C. 2003. Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for industrial Enterococcus faecium colonization? Vet. Microbiol.92:111-119

Son, V.M., Chang, C.C., Wu, M.C., Guu, Y.K. and Chiu, C.H., 2009. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillusplantarum*, enhanced the growth, innate immune responces, and disease resistance of the grouper *Epinepheluscoioides*. Fish & Shellfish Immunology, 26, 691-698.

Sun, Y.Z., Yang, H.L., Ma, R.L and Lin, W.Y. 2010. Probiotic applications of two dominant gut Bacillus strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinepheluscoioides*. Fish & Shellfish Immunology. 29: 803-809.

University of OttawaIGEM.2009. *Lactobacillus plantarum*. www..ipm- int.org/boxmode/pdf/

Venkat, H.K., Sahu, N.P. and Jain, K.K. 2004. Effect of feeding *Lactobacillus*-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachiumrosenbergii* (de Man). Aquaculture Research 35: 501-507

Walford, J. and Lam, T.J. 1993. Development of thedigestive tract and proteolytic enzyme activity in Sea bass (*Latescalcarifer*) larvae and juveniles.Aquaculture, 109: 187–205.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ข้อมูลคุณภาพน้ำในผ้าใบที่ทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวในระบบปิดน้ำหมุนเวียน

สัปดาห์ที่	ชุดการทดลอง	พารามิเตอร์					
		Temp. (°C)	Salinity (psu)	DO (mg./L)	pH	Alkalinity (mg./L)	NH_3 (mg./L)
1	T_1	25.7 ± 0.4	20 ± 0.7	6.6±0.5	7.8 ± 0.02	88.1 ± 2.8	0.011 ± 0.018
	T_2	25.4 ± 0.3	20 ± 0.5	5.8±0.45	7. 9 ± 0.02	93.5 ± 3.7	0.018 ± 0.014
	T_3	25.6 ± 0.4	20 ± 0.6	6.2±0.5	7.9 ± 0.03	94.1 ± 3.5	0.016 ± 0.016
	T_4	25.1 ± 0.5	20 ± 0.5	7.1±0.4	7.9 ± 0.05	90.6 ± 3.6	0.010 ± 0.018
	T_5	25.7 ± 0.3	20 ± 0.7	6.3±0. 5	7.9± 0.02	96.1 ± 1.2	0.012 ± 0.014
2	T_1	25.8 ± 0.3	20 ± 0.4	6.8±0.4	7.5 ± 0.01	90.4 ± 2.2	0.056 ± 0.016
	T_2	25.9 ± 0.6	20 ± 0.5	7.6±0.5	7.7 ± 0.02	98.1 ± 2.8	0.031 ± 0.018
	T_3	26.1 ± 0.4	20 ± 0.5	7.8±0.4	7.7 ± 0.02	95.5 ± 3.7	0.028 ± 0.014
	T_4	25.9 ± 0.3	20 ± 0.3	6.3±0.5	7.8 ± 0.02	97.1 ± 3.5	0.036 ± 0.016
	T_5	25.7 ± 0.5	20 ± 0.4	7.1±0.4	7.8 ± 0.01	90.6 ± 3.6	0.024 ± 0.014
3	T_1	26.2 ± 0.4	20 ± 0.5	5.4±0. 5	7.4 ± 0.03	95.1 ± 1.2	0.065 ± 0.016
	T_2	26.8 ± 0.5	20 ± 0.3	6.3±0.3	7.7 ± 0.01	97.4 ± 2.2	0.048 ± 0.034
	T_3	26.7 ± 0.5	20 ± 0.4	6.7±0.5	7.6 ± 0.02	90.6 ± 3.6	0.039 ± 0.012
	T_4	26.4 ± 0.4	20 ± 0.6	6.4±0.4	7.5 ± 0.03	96.1 ± 3.6	0.053 ± 0.019
	T_5	26.3 ± 0.3	20 ± 0.4	6.5±0.5	7.5 ± 0.05	98.4 ± 2.2	0.044 ± 0.018
4	T_1	26.2 ± 0.4	20 ± 0.1	5.0±0. 5	7.3 ± 0.05	90.1 ± 1.2	0.310± 0.026
	T_2	26.9 ± 0.5	20 ± 0.3	6.3±0.3	7.5 ± 0.04	92.4 ± 2.2	0.345 ± 0.074
	T_3	26.9 ± 0.5	20 ± 0.2	6.7±0.5	7.6 ± 0.03	98.6 ± 3.6	0.287 ± 0.072
	T_4	26.8 ± 0.4	20 ± 0.1	6.4±0.4	7.7 ± 0.01	101.1 ± 3.6	0.245 ± 0.059
	T_5	26.8 ± 0.3	20 ± 0.4	6.5±0.5	7.6 ± 0.03	102 ± 2.2	0.243 ± 0.038

หมายเหตุ: T_1, T_2, T_3, T_4, T_5 หมายถึง ชุดการทดลองที่ปลากะพงขาวได้รับการเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกในอัตราส่วน 0, 10, 20 และ 30 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

สัปดาห์ที่	ชุดการทดลอง	พารามิเตอร์					
		Temp. (°C)	Salinity (psu)	DO (mg./L)	pH	Alkalinity (mg./L)	NH_3 (mg./L)
	T_1	26.4 ± 0.3	20 ± 0.7	5.7±0.7	7.3 ± 0.04	98.1 ± 2.7	0.410± 0.016
	T_2	26.8 ± 0.2	20 ± 0.5	5.5±0.5	7. 4 ± 0.03	103.5 ± 3.2	0.475 ± 0.044
5	T_3	26.8 ± 0.2	20 ± 0.6	6.2±0.6	7.5 ± 0.02	97.1 ± 3.4	0.397 ± 0.032
	T_4	26.7 ± 0.1	20 ± 0.5	6.1±0.5	7.5 ± 0.05	95.6 ± 3.8	0.385 ± 0.049
	T_5	26.8 ± 0.2	20 ± 0.7	6.3±0.4	7.7± 0.02	98.1 ± 2.2	0.388 ± 0.068
	T_1	27.2 ± 0.2	20 ± 0.4	5.8±0.4	7.2 ± 0.01	98.4 ± 3.2	0.656 ± 0.036
	T_2	27.3 ± 0.1	20 ± 0.5	5.6±0.5	7.3 ± 0.02	102.1 ± 3.8	0.601 ± 0.048
6	T_3	27.2 ± 0.3	20 ± 0.5	5.8±0.7	7.4 ± 0.02	101.5 ± 2.7	0.528 ± 0.054
	T_4	27.2 ± 0.2	20 ± 0.3	6.0±0.8	7.5 ± 0.02	105.1 ± 3.5	0.621 ± 0.036
	T_5	27.3 ± 0.1	20 ± 0.4	6.1±0.5	7.4 ± 0.01	103.6 ± 3.6	0.524 ± 0.024
	T_1	27.5 ± 0.3	20 ± 0.5	5.6±0.3	7.1 ± 0.03	104.1 ± 3.2	0.933 ± 0.036
	T_2	27.6 ± 0.2	20 ± 0.3	5.3±0.3	7.3 ± 0.01	108.4 ± 3.2	0.732 ± 0.054
7	T_3	27.7 ± 0.1	20 ± 0.4	5.2±0.5	7.4 ± 0.02	105.6 ± 2.6	0.648 ± 0.043
	T_4	27.7 ± 0.1	20 ± 0.6	5.4±0.4	7.5 ± 0.04	110.1 ± 3.6	0.634± 0.022
	T_5	27.6 ± 0.2	20 ± 0.4	5.5±0.5	7.5 ± 0.02	108.4 ± 3.2	0.876± 0.071
	T_1	28.7 ± 0.4	20 ± 0.1	5.5±0. 5	6.9 ± 0.04	100.1 ± 3.2	1.310± 0.056
	T_2	28.8 ± 0.4	20 ± 0.3	5.0±0.3	7.2 ± 0.05	112.4 ± 3.5	1.312 ± 0.090
8	T_3	28.7 ± 0.4	20 ± 0.2	5.2±0.8	7.4 ± 0.05	108.6 ± 3.4	0.987 ± 0.082
	T_4	28.7 ± 0.4	20 ± 0.1	5.0±0.7	7.3 ± 0.02	115.1 ± 3.6	0.990 ± 0.099
	T_5	28.7 ± 0.3	20 ± 0.1	4.6±0.3	7.2 ± 0.04	114 ± 2.2	0.980 ± 0.083

หมายเหตุ: T_1, T_2, T_3, T_4, T_5 หมายถึง ชุดการทดลองที่ปลากะพงขาวได้รับการเสริมจุลินทรีย์โปรไบโอติกในอัตราส่วน 0, 10, 20 และ 30 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 กิโลกรัม